



Importância médico-legal do Pb.
Inflamação e cancro.

Sandra Maria Teixeira Coutinho Pereira

Dissertação de Mestrado em Medicina Legal

2013

Sandra Maria Teixeira Coutinho Pereira

Importância médico-legal do Pb
Inflamação e cancro.

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em
Medicina Legal submetida ao Instituto de Ciências
Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto

Orientador - Professora Doutora Maria José Carneiro de
Sousa Pinto da Costa

Categoria - Professora associada do Instituto de
Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade
do Porto

Afiliação - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel
Salazar da Universidade do Porto

Universidade do Porto
Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar
Mestrado de Medicina Legal

Sandra Maria Teixeira Coutinho Pereira

À memória da minha avó Guilhermina
Aos meus filhos (Guilherme e Margarida), ao Pedro e aos meus Pais

Sumário

De entre as várias situações de intoxicação/incapacidade descritas e já regulamentadas, do ponto de vista histórico, social e económico, salienta-se o fenómeno de intoxicação/incapacidade por exposição, ao chumbo (Pb).

Em Portugal, procurando entender as alterações que ao longo dos anos a aplicação de medidas legislativas vieram introduzir nas organizações, e simultaneamente avaliar a sua adequabilidade e suficiência, descreve-se no presente trabalho uma metodologia que permite avaliar a exposição de um organismo a um agente tóxico, o Pb, e que revela ser fundamental para que possam ser avaliadas as principais implicações sobre os organismos, assim como ser tomadas medidas de prevenção contra os seus efeitos na saúde dos mesmos.

A biomonitorização humana tem vindo a assumir cada vez mais importância nos estudos epidemiológicos[1-3], uma vez que veio permitir uma avaliação periódica mais adequada devido a fatores de variabilidade individual, tais como: exposição cumulativa; horários de trabalho; toxicocinética; susceptibilidade genética [1, 4], com a consequente extrapolação de uma dada situação, de exposição, que possa resultar num eventual dano para a saúde[5], nomeadamente doenças neurodegenerativas e cancro.

O Pb sempre foi importante em termos de biomonitorização devido ao seu papel como potencial agente causal de efeitos adversos na saúde [6, 7].

Esta dissertação teve como objetivo fundamental investigar a presença intracelular de Pb em sistemas biológicos e caracterizar, a nível celular, a ingestão de Pb por fagócitos extrapolando os efeitos agudos de imunotoxicidade induzidos pelo metal.

Como método principal de detecção de Pb *in situ* escolheu-se a microscopia electrónica de varrimento acoplada a um sistema de detecção Noran Voyager de microanálise elementar de raios-X com sistema de detecção EDS (*Energy Dispersive Spectrometry*). Este método permitiu a observação com alta resolução do Pb nos elementos celulares.

Os biomarcadores, resposta biológica, física ou comportamental, ao nível humano (celular ou molecular), face a exposição a um químico ambiental[3], são de grande importância no estudo em modelos animais, já que contribuem para a clarificação dos mecanismos de toxicidade[8, 9], permitindo estimar o efeito biológico sobre o tecido alvo e ao mesmo tempo são utilizados nas ciências médicas, como sinais de alerta precoces, antes do paciente manifestar os efeitos clínicos causados pela doença[10], pois revelam-se marcadores de alterações subclínicas indicadores da patologia, de modo que eles

podem ser úteis quer no diagnóstico, quer na elaboração de estratégias de prevenção; que tem em conta a variabilidade inter e intra-individual em resposta aos xenobióticos.

Na presente dissertação foram realizados estudos *in vivo* em ratinhos BALB/c. Foi utilizado um modelo animal de inflamação que consiste na formação de uma bolsa de ar subcutânea. O estudo foi direccionado para estudo da resposta aguda inicial, tanto inflamatória como imunotóxica.

Palavras-chave: metais pesados; Pb; legislação; tóxico; toxicocinética; toxicodinâmica; biomarcadores; ratinhos BALB/c; inflamação; doenças neurodegenerativas; cancro.

Abstract

Among the various situations of intoxication / disability described and regulated in terms of historical, social, and economics, stands out the phenomenon of intoxication/disability from exposure to lead (Pb).

In Portugal, in order to understand the changes that over the years the application of legislative measures have introduced in organizations, and simultaneously evaluate the suitability and sufficiency, we describe in this paper a methodology to assess the exposure of an organism to a toxic agent, Pb, and that turns out to be fundamental in order that major implications in the organizations are evaluated, as well as preventive measures are taken against the health effects of the same.

The human biomonitoring has assumed increasing importance in epidemiological studies [1-3], since it has allowed a periodic assessment most appropriate due to individual variability factors, such as cumulative exposure, work schedules; toxicokinetics; susceptibility gene [1,4], with the consequent extrapolation of a given situation, exposure, which may result in possible damage to health [5], including neurodegenerative diseases and cancer.

The Pb has always been important in terms of biomonitoring due to its role as a potential causal agent of adverse health effects [6, 7].

This dissertation aimed to investigate the intracellular presence of Pb and characterize biological systems at the cellular level, ingestion of Pb by phagocytes and extrapolating the acute effects of immunotoxicity induced by the metal. As a main method for detection Pb *in situ* chose the scanning electron microscope coupled to a detection system Noran Voyager elemental microanalysis X-ray detection system with EDS (Energy Dispersive Spectrometry). This method allowed the observation with high-resolution Pb in cellular elements.

Biomarkers, biological response, physical or behavioral, human level (cellular or molecular), compared with exposure to a chemical environment [3], are of great importance in studies in animal models, as they contribute to clarify the mechanisms of toxicity [8,9], allowing to estimate the biological effect on the target tissue while in medical science are used as early warning signs before the patient manifesting the clinical effects caused by the disease [10] as markers are revealed changes subclinical disease indicators, so that they can be useful both in diagnosis, both in devising strategies for prevention, which takes into account the variability in inter and intra-individual in response to xenobiotics.

In this dissertation studies were performed *in vivo* in BALB/c mice. We used an animal model of inflammation that consists on the formation of an air bag subcutaneously.

The study was directed to study the initial acute response, both inflammatory and immunotoxic.

Keywords: heavy metals; Pb; legislation; toxic; toxicokinetics; toxicodynamics; biomarkers, BALB/c, inflammation, neurodegenerative diseases, cancer.

Agradecimentos

Um trabalho concluído dificilmente é o resultado de uma decisão e de uma ideia momentânea ou isolada. Pelo contrário ele reflete todo um percurso académico-profissional, um conjunto de influências, trocas de experiências, opções, momentos de partilha e tomadas de decisão.

Enfim, todo um crescimento e uma maturidade que se vai ganhando e construindo sob a influência de quem tem algo a ensinar, gosto pelo que faz e vontade de continuar a aprender e a desafiar. Muito deste crescimento, não só profissional, devo-o a todos os tutores e amigos que foram passando pelo meu percurso, a quem agradeço todos os ensinamentos, incentivos, estímulos e acima de tudo espírito crítico.

Ao Professor Doutor José Pinto da Costa; à Professora Doutora Maria José Pinto da Costa; à Professora Doutora Maria de Lurdes Bastos; à Professora Doutora Elsa Bronze; ao Professor Doutor Jorge Pedrosa; à Professora Doutora Mónica Cunha; ao Professor Doutor João Sousa; ao Doutor Elísio Costa; ao *meu* Mestre Pedro Santos; à Mestre e amiga Sandra Maia; à Mestre e amiga Sara Pacheco; à amiga e colaboradora Sofia Moura; à Mestre Fátima Lopes; ao Mestre e amigo Armando Coutinho-Pereira; aos amigos Cristina Silva; Elisa Lopes; Joaquim Aguiar; Rita Alcântara; D. Fátima; Manuela Carneiro e Susana.

...

A **TODOS** aqui deixo o meu sincero agradecimento por esta jornada...Muito Obrigada!

Lista de figuras

Fig. 1A – Vias que ligam a inflamação e o cancro

Fig. 1B – Principais vias de exposição, entrada, transporte, armazenamento e excreção do Pb no organismo humano.

Fig. 2A – Tipos de radiação emitida por uma amostra quando submetida a um feixe de elétrons.

Fig. 3A – Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de células inflamatórias peritoneais, após 24 horas.

Fig. 3B – Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de células inflamatórias peritoneais, após 24 horas.

Fig. 3C – Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de uma célula inflamatória peritoneal, após 72 horas.

Fig. 3D – Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de uma célula inflamatória peritoneal, após 72 horas.

Fig. 3E – Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de uma célula inflamatória da bolsa de ar subcutânea, após 48 horas.

Fig. 3F – Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de uma célula inflamatória da bolsa de ar subcutânea, após 48 horas.

Fig. 3G – Espectro de SEM-XRM dos pontos (ER) assinalados numa célula inflamatória peritoneal.

Fig. 3H – Espectro de SEM-XRM dos pontos (ER) assinalados numa célula inflamatória peritoneal.

Fig. 3I – Espectro de SEM-XRM dos pontos (ER) assinalados numa célula inflamatória da bolsa de área subcutânea.

Fig. 3J – Espectro de SEM-XRM dos pontos (ER) assinalados numa célula inflamatória da bolsa de área subcutânea.

Abreviaturas, siglas e algumas definições

a.C. - antes de Cristo

ADN - Ácido Desoxirribonucleico

ALA - ácido δ -aminolevulínico

ALAD - ácido δ -aminolevulínico desidratase

ALAD - gene do ácido δ -aminolevulínico desidratase

Al - Alumínio

Ar - Arsénio

ARN - Ácido Ribonucleico

ASTDR - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*

Au - Ouro

BSA - *Bovine Serum Albumin*

C - Carbono

Ca - cálcio

CCL2 - *chemokine (C-C motif) ligand 2*

Cd - Cádmio

Co – Cobalto

COX-2 – Ciclooxigenase-2

Cr - Crómio

Cu - Cobre

DA - Doença de Alzheimer

d.C. - depois de Cristo

DL - Decreto-Lei

DR - Diário da República

EDS - *Energy Dispersive Spectrometry*

ER - electrões retrodifundidos

ES - electrões secundários

eV - uma unidade de medida de energia (eletrão-Volt)

Fe - Ferro

HCV - vírus da Hepatite C

Hg - Mercúrio

HIF1 α - fator 1 α induzível por hipoxia

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

KV - Kilovolt

LRP1 - *Low density lipoprotein receptor-related protein*

M-CSF - *Macrophage-colony stimulating factor*

microARN - Pequeno Ácido Ribonucleico, com cerca de 20 a 22 nucleotídeos
Mn - Manganês
m/m - massa/massa
ND - *Neurodegenerative diseases*
NK - Células *Natural Killer*
OMS - Organização Mundial de Saúde
P - Fósforo
Pa - Unidade padrão de pressão e tensão no sistema internacional (Pascal)
Pb, Pb²⁺ - Chumbo
PDGF - *Platelet-derived growth factor*
PNUMA - Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente
Q.I. - Quociente de inteligência
ROI - *Reactive oxygen intermediates*
séc. - século
SEM - *Scanning Electron Microscopy*
SH - Grupo tiol
SNC - Sistema Nervoso Central
STAT3 - *Signal transducer and activator of transcription 3*
TAM - *Tumor-associated macrophages*
Th2 - linfócitos T *helper* tipo 2
TNF - *Tumor necrosis factor*
TNI – Tabela nacional de incapacidades
Unidades: µl-microlitro; µm-micrómetro; cm-centímetro; g-grama; mg-miligramas; ml-mililitro
United States EPA – United States Environmental Protection Agency
V - Vanádio
Xenobiótico - Substância química exógena
Zn - Zinco

ÍNDICE

Sumário	i
Abstract	iii
Agradecimentos	v
Lista de figuras	vi
Abreviaturas, siglas e algumas definições	vii
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introdução.....	1
1.1. Metais pesados	2
1.2. A inflamação.....	4
1.2.1. Inflamação e cancro	5
1.2.2. Inflamação e doenças neurodegenerativas	10
1.3. O chumbo.....	11
1.4. A toxicologia ocupacional	18
1.5. A medicina do trabalho	20
1.6. A tabela nacional de incapacidades.....	21
1.7. A medicina legal e o seu carácter social.....	22
CAPÍTULO 2.....	24
2. Objetivos e justificação do estudo.....	24
2.1. Material e métodos	25
2.1.1. Ensaaios <i>in vivo</i> - Modelo animal.....	25
2.2. Procedimento experimental	25
2.2.1 Indução da Inflamação	25
2.2.2. Técnica SEM-XRM	26
CAPÍTULO 3.....	29
3. Resultados.....	29
CAPÍTULO 4.....	35
4. Discussão	35
5. Bibliografia.....	38

CAPÍTULO 1

1. Introdução

A Medicina Legal é uma ciência de largas proporções e importância nos interesses da comunidade, porque existe e pratica-se em função das necessidades de ordem pública e social. É uma disciplina de amplas possibilidades e de profunda dimensão, porque não se resume ao estudo da Medicina, mas sim a um somatório de todas as especialidades médicas acrescidas de fragmentos de outras ciências acessórias, destacando-se o Direito.

É difícil definir com precisão a medicina legal. Cada especialista define-a de acordo como a sua vertente prática, a sua contribuição e importância. Vejamos a definição de alguns especialistas em medicina legal: *É a medicina considerada nas suas relações com a existência das leis e a administração da Justiça* (Adelon); *é a ciência do médico aplicada aos fins da ciência do Direito* (Buchner); *é a aplicação do conhecimento médico-cirúrgico à legislação* (Peyró e Rodrigo); *é a disciplina que utiliza a totalidade das ciências médicas para dar respostas às questões judiciais* (Bonnet); *é a aplicação de conhecimentos biomédicos e de outros conhecimentos científicos às questões de Direito* (José P. Costa).

Embora seja comprovada a participação médica em processos judiciais, os antigos não conheciam a medicina legal como ciência.

Pompílio, em Roma, ordenou o exame médico na morte das grávidas. Adriano e Justiniano utilizaram os conhecimentos médicos para esclarecer factos de interesse da Justiça.

Iniciou-se a perícia médica, com a legislação de 1209, por um decreto de Inocêncio III.

Gregório IX, em 1234, exigia a opinião médica para distinguir entre os ferimentos, aquele considerado mortal e até no cancelamento de casamentos, caso houvessem suspeitas comprovadas de sexo entre os noivos antes da cerimónia.

O início da medicina legal prática foi na Itália, em 1525. Foi no séc. XVI que a medicina legal teve a sua contribuição reconhecida, quando começou a ser exigida a presença dos peritos na avaliação dos diversos tipos de delitos. Em 1521, quando o Papa Leão X morreu com suspeita de envenenamento o seu corpo foi autopsiado.

Ambroise Paré é considerado o pai da medicina legal, porque lançou o primeiro tratado de medicina legal, em 1575. Nos séculos seguintes, mais avanços acontecem, principalmente na área da toxicologia.

A *toxicologia forense* prende-se com a problemática dos venenos, análise dos seus efeitos e classificação de forma a dar indicações seguras para os juristas poderem enquadrar na tipificação dos respectivos crimes de envenenamento ou de administração/exposição a substâncias que podem prejudicar a saúde sem serem susceptíveis de causar a morte.

Dentro deste âmbito podemos enquadrar a presença constante de metais pesados no meio ambiente e laboral.

1.1. Metais pesados

Os metais compõem um grupo de elementos químicos sólidos no seu estado puro (com exceção do mercúrio, que é líquido) caracterizados pelo seu brilho, dureza, cor amarelada a prateada, boa condutividade, maleabilidade, ductibilidade, além de elevados pontos de fusão e ebulição. Aqueles que apresentam uma densidade mais elevada são denominados metais pesados. Além da densidade elevada, o que, em números, equivale a mais de $4,0 \text{ g/cm}^3$, os metais pesados também se caracterizam por apresentarem altos valores de número atómico, massa específica e massa atómica.

As principais propriedades dos metais pesados, também denominados elementos traço, são os elevados níveis de reatividade e bioacumulação. Isto quer dizer que tais elementos, além de serem capazes de desencadear diversas reações químicas, não metabolizáveis, permanecem em carácter cumulativo ao longo da cadeia alimentar.

Embora não sejam metabolizáveis, alguns metais pesados participam, em pequenas quantidades, em certas atividades metabólicas, como, por exemplo, o cobalto (Co), que participa da produção dos glóbulos vermelhos; o cobre (Cu), que compõe diversas enzimas e é essencial para a síntese da hemoglobina; o vanádio (V), que interfere na atividade da insulina; entre outros. Porém, se a quantidade desses elementos no corpo exceder os níveis essenciais, eles passam a ser tóxicos, causando sérios riscos à saúde.

Outros destes elementos, não são utilizáveis de nenhuma forma pelos organismos vivos, ao contrário, são extremamente tóxicos aos mesmos. Na natureza, tais elementos praticamente não são encontrados de forma isolada (já que são muito reativos), todavia, são muito utilizados pela indústria, sendo lançados juntamente com os resíduos industriais ao meio ambiente. Tais resíduos podem ser absorvidos por vegetais e

animais, causando intoxicações em todos os níveis da cadeia alimentar. Entre os principais podemos citar:

Mercúrio (Hg) - metal líquido à temperatura ambiente oriundo da degradação natural da crosta terrestre, inodoro, volátil, insolúvel em água e altamente tóxico. No organismo humano, esse elemento químico age de forma devastadora: uma vez absorvido, deposita-se em várias regiões do corpo, tais como cérebro, rins, aparelhos digestivo e reprodutivo, pulmões, rins, fígado, pâncreas e outros, causando graves distúrbios, por vezes irreversíveis.

Crômio (Cr) - metal de alta dureza, muito empregado no ramo da metalurgia para ampliação da resistência a agentes corrosivos. Dentre os principais danos causados no organismo, estão as lesões na pele, bronquite e, se a exposição ocorrer em doses mais elevadas, pode levar ao desenvolvimento de células cancerígenas.

Cádmio (Cd) - metal caracterizado principalmente pela sua maleabilidade e ductibilidade, utilizado principalmente na indústria de baterias e na galvanoplastia. Esse elemento pode gerar efeitos tóxicos ao organismo humano, ainda que em quantidades moderadas, atingindo órgãos vitais como rins, fígado e pulmões. A intoxicação por cádmio pode provocar danos no sistema ósseo, cânceros, entre outros distúrbios.

Arsênio (Ar) - metal pesado aplicado aos processos de conservação da madeira e do couro, fabricação do vidro e metalurgia. A contaminação por esse elemento químico pode provocar lesões não cicatrizáveis na epiderme, lesões em diversos órgãos vitais, alguns tipos de cancro, nomeadamente o da pele, e, se em concentrações elevadas, a morte.

Chumbo (Pb) - metal pesado bastante maleável, de baixa condutividade elétrica, largamente utilizado em processos de soldagem, na construção civil, bem como na indústria de munições e tintas. A sua maleabilidade, facilidade de formar ligas metálicas e baixo ponto de fusão (327,4°C) conferem-lhe uma grande importância comercial, sendo amplamente utilizado na indústria [6]. O Pb tem um fraco poder condutor da eletricidade e baixa resistência à tração mecânica, mas resiste fortemente à corrosão e é um bom isolante das ondas sonoras e das radiações ionizantes. Trata-se de um dos mais perigosos entre os metais pesados, provocando principalmente alterações nos sistemas nervoso central e periférico, medula óssea e rins.

O Pb foi uma das substâncias químicas a ser submetida a uma legislação para controlo da exposição em ambiente laboral estando também na lista elaborada pela “United States EPA” que relaciona os poluentes atmosféricos de maior risco para a saúde humana[11]. É um dos metais pesados que juntamente com o Hg e o Ar estão

contemplados na tabela nacional de incapacidade (TNI) e o maior risco de exposição a estes tóxicos é por ocupação profissional[12].

A definição do conceito de tóxico é complexa, uma vez que qualquer substância, mesmo aquelas que fazem parte essencial dos organismos vivos, pode ser lesiva ou produzir transtornos no equilíbrio biológico. Nesta medida, todas as substâncias seriam tóxicas, incluindo aquelas que à partida, são habitualmente assumidas como alimentos ou medicamentos.

São vários os critérios pelos quais os tóxicos podem ser classificados. Para melhor sistematização classificam-se os tóxicos de acordo com os métodos extractivos adequados ao isolamento do analito. Assim consideram-se sete grupos de tóxicos: gases; substâncias voláteis; substâncias orgânicas termoláveis; metais ou metalóides; pesticidas; aniões; outras substâncias mais específicas.

A exposição constante a metais pesados pode levar ao desenvolvimento de processos inflamatórios[13].

1.2. A inflamação

Há um conjunto de processos que são desencadeados, e que são responsáveis pela reparação dos tecidos em todos os organismos vivos, aquando da ocorrência de um dano.

Esses mecanismos são essenciais para a manutenção da integridade do organismo humano bem como para a sua reconstrução permanente diante das inevitáveis agressões. Quando bem regulados e em equilíbrio com as outras funções celulares, esses processos são harmoniosos e autolimitados, parando assim que as reparações teciduais tenham sido efetuadas. Estes processos caracterizam aquilo que habitualmente denominamos de inflamação.

Quando um tecido é afetado através de contusão, corte ou queimadura e desencadeia uma infecção e inflamação, esta é imediatamente detetada pelas plaquetas do sangue que se aglutinam em volta do local afetado. Ao aglutinarem-se, liberam uma substância química, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) que tem como função alertar os leucócitos do sistema imunológico. Estas, por sua vez, irão produzir uma série de mediadores químicos: citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos que têm múltiplos efeitos, e vão orientar o processo de reparação tecidual.

Seguidamente os tecidos adjacentes tornam-se permeáveis para que as células imunológicas possam penetrar e chegar ao local para destruir os agentes agressores,

induzindo no local uma nova formação de pequenos vasos sanguíneos, de forma a permitir a chegada de oxigénio e nutrientes ao local da lesão a ser reparada.

As células imunológicas que tinham sido ativadas diante dos agentes agressores recolocam-se em estado de vigília a fim de evitar que, no impulso, ataquem os tecidos sãos.

Diante do exposto, é sabido que as lesões cancerígenas aproveitam a deficiência desses mecanismos de reparação para invadir e disseminar pelo organismo levando-o à morte.

Esta dupla face da inflamação prevista para garantir a reparação tecidual visando a cura, pode sofrer mudanças na sua orientação, e passar a colaborar com o crescimento da lesão cancerígena.

1.2.1. Inflamação e cancro

A inflamação crónica e persistente contribui para o desenvolvimento do cancro e pode predispor à carcinogénese.

Em 1863, Virchow, observou que diversos pacientes pareciam ter desenvolvido cancro, no local onde anteriormente, tinham recebido um traumatismo, ou onde existia uma lesão persistente que nunca cicatrizava.

Mais tarde Dvorak, 1986, retomou essa hipótese, apoiando-se desta vez em argumentos baseados no seu artigo intitulado “Tumores, feridas que não curam”. Baseado nisso, Junior Peek *et al.*, 2005, demonstraram que o papel desempenhado pela inflamação no desenvolvimento do cancro é considerado de grande importância divulgando um documento que descreve com precisão, os processos pelos quais as células cancerosas conseguem confundir e perverter os mecanismos de cura do organismo. Demonstrando que da mesma maneira que as células imunológicas agem para reparar as lesões, as células cancerosas devem produzir os fatores da inflamação para sustentar e manter de forma excecível o crescimento tumoral em desenvolvimento.

As infecções que levam à inflamação estão envolvidas na patogénese de aproximadamente 15-20% dos tumores humanos. No entanto, mesmo os tumores que não estão associados epidemiologicamente a agentes patogénicos são caracterizados pela presença de uma componente inflamatória no seu microambiente. Marcas de inflamação associadas a cancro incluem a presença de leucócitos infiltrantes, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, mensageiros lipídicos e enzimas que degradam a matriz.

Assim, o processo que permite ao sistema imunológico reparar lesões e destruir os agentes agressores do organismo é desviado a favor das células cancerosas, que se

apoderam dele para proliferar e propagar. Devido à inflamação, elas infiltram-se nos tecidos vizinhos e penetram nos fluxos sanguíneo e linfático para disseminar e originar as metástases.

O excesso dessas substâncias acarreta por sua vez, nos tecidos adjacentes, o bloqueio de um processo natural, a apoptose, ou seja, o suicídio celular geneticamente programado para a proliferação anárquica dos tecidos. A célula cancerosa vê-se assim protegida da destruição celular e o tumor vai ganhando tamanho.

Em suma, pode-se dizer que ocorre uma hiperprodução de fatores inflamatórios que tem como finalidade desorientar as células de defesa. Os glóbulos brancos e as células *Natural Killer* (NK) são neutralizados, parando de lutar contra o tumor, que se desenvolve, aumentando gradativamente.

As NK são ativadas em resposta a diversos estímulos, nomeadamente as citocinas produzidas por outros elementos do sistema imunitário, por estimulação dos receptores de Imunoglobulinas FcR, presentes na sua membrana celular, e pelos receptores de ativação ou inibição, específicos das células NK. São componentes importantes na defesa imunitária não específica, originárias da medula óssea, são descritas como grandes e granulares.

Nos últimos anos temos assistido a um renascimento da investigação sobre a ligação entre inflamação e cancro[14, 15].

Há achados clínicos que revelam que a inflamação associada a cancro inclui a infiltração de leucócitos, macrófagos associados a tumor (TAM) [16], expressão de citocinas tais como o fator de necrose tumoral (TNF) ou a interleucina (IL)-1, quimiocinas tais como CCL2, remodelação de tecidos e angiogénese.

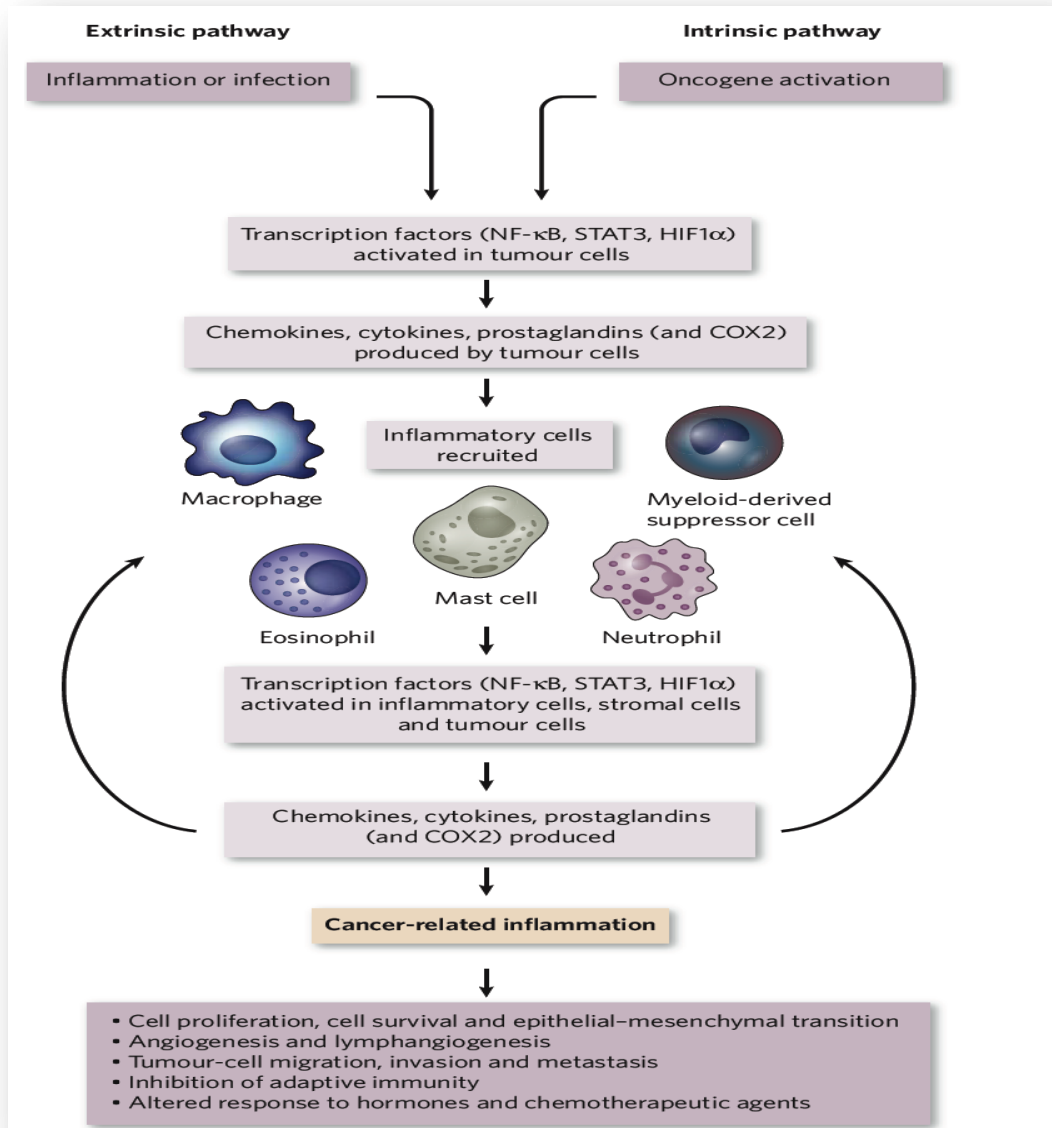
Sucintamente, a doença inflamatória e o cancro, que tem vindo a ser relatadas estão intimamente ligadas através de uma via comum: a cascata da inflamação. Há de facto evidências genéticas que levam à transformação neoplásica promovendo a construção de um ambiente inflamatório, leucócitos infiltrantes no tumor, em especial os macrófagos que são reguladores principais da inflamação e cancro.

Assim sendo, há autores que propõem uma subdivisão em via intrínseca da inflamação e via extrínseca (Fig. 1A).

A primeira ativada por eventos genéticos que causam neoplasia. Estes eventos incluem a ativação de vários tipos de oncogene por mutação, amplificação ou rearranjo cromossómico, e a inativação de genes supressores de tumores. As células que são transformadas desta forma produzem mediadores inflamatórios, gerando assim um microambiente inflamatório em tumores para os quais não existe condição inflamatória subjacente (por exemplo, tumores de mama).

Em contraste, a via extrínseca da inflamação, expressa através de leucócitos infiltrantes tumorais aumentam o risco de desenvolver cancro em determinados locais anatómicos (por exemplo, o cólon, próstata e pâncreas).

Fig. 1A



(Fonte: *Nature*. Review [17])

Figura 1A - Vias que ligam a inflamação e o cancro.

As duas vias convergem resultando na ativação de fatores de transcrição, principalmente o fator NF- κ B, transdutor de sinal e o fator 3 ativador de transcrição (STAT3) e fator 1 α induzível por hipoxia (HIF1 α), em células tumorais. Estes fatores de transcrição coordenam a produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas, bem como a produção de ciclooxigenase-2 (COX-2) que, por sua vez,

resulta na produção de prostaglandinas. Estes fatores recrutam e ativam vários leucócitos, mais notavelmente as células da linhagem mielomonocítica. As citocinas ativam os mesmos fatores de transcrição importantes em células inflamatórias, células estromais e células de tumor, resultando em mais mediadores inflamatórios sendo assim produzido um microambiente inflamatório.

As condições inflamatórias que afetam órgãos tais como o fígado, o pâncreas, estômago, cólon e próstata estão associadas a um risco aumentado de cancro. Abordagens genéticas têm demonstrado o papel dos componentes-chave da inflamação na carcinogénese. Estes incluem citocinas inflamatórias primárias (IL-1, TNF), IL-6, fatores de crescimento hematopoiéticos (M-CSF) e o fator de transcrição NF-KB [15, 18, 19]. Além de promover os primeiros passos da carcinogénese, pode promover a invasão tumoral e metástases.

As primeiras observações [20,21], foram seguidas por análise genética de polimorfismos de genes de citocinas em diversos tumores, especialmente em malignidade gastrointestinal. Indivíduos com polimorfismos no gene IL-1 (IL-1B-31 * C ou T-511 * e IL-1RN * 2 / * 2 genótipos) estão em maior risco de desenvolver atrofia gástrica, em resposta à infecção por *H. pylori* [22]. Os polimorfismos na IL-1, tem sido associado a um aumento do risco de progressão para o carcinoma hepatocelular em doentes com infecção crónica pelo HCV [23], e com a sobrevivência encurtada no cancro pancreático. Além disso, a IL-1, nos genótipos pró-inflamatórias da TNF e IL-10 também foram identificados como fatores de risco para o cancro gástrico [24] e para o cancro colo-rectal [25]. Mais recentemente, tem sido relatada uma associação significativa entre o polimorfismo TLR4 Asp299Gly e aumento do risco de cancro gástrico [26].

A evidência clínica sobre o papel permissivo de inflamação crónica na promoção de tumores tem recebido confirmações em modelos moleculares associadas à inflamação, que forneceu evidência *in vivo* para o papel central da inflamação do NF-kB mediada por tumorigénese. O NF-kB induz várias alterações celulares associadas à tumorigénese e fenótipos mais agressivos, incluindo a autossuficiência em sinais de crescimento, insensibilidade à inibição do crescimento, resistência a sinais apoptóticos; imortalização; angiogénese, invasão tecidual e metástase. A ativação constitutiva do NF-kB, muitas vezes observada em células cancerosas, pode ser promovida tanto por sinais do microambiente, incluindo citocinas, hipóxia e intermediários reativos de oxigénio (ROI), ou por alterações genéticas [27].

As células cancerosas reproduzem-se mais, porém têm menor capacidade de reparar danos comparativamente com as células saudáveis. O dano ao ADN é herdado através da divisão celular, que é transferido a outras células cancerosas, fazendo-as

morrer ou multiplicarem-se mais lentamente. Uma das principais limitações da radioterapia é que as células de tumores sólidos ficam deficientes em oxigênio, o que as torna mais resistentes aos efeitos da radiação, uma vez que o oxigênio provoca danos no ADN permanentes.

Numerosos estudos indicam que a ativação do NF-κB pode bloquear as vias de sinalização da morte celular. A sua ativação protege as células da cascata apoptótica. O fator ativo migra para o núcleo e provoca a ativação transcripcional de genes associados com a proliferação celular, a angiogénese, as metástases e a supressão da apoptose. Ele pode controlar a progressão do ciclo celular e possivelmente a diferenciação celular.

O NF-κB ativado, promove a oncogénese e a resistência à terapêutica clínica. Ele pode estar ativo em 85% dos cancros humanos e muitos acreditam que seja o principal culpado pela iniciação e manutenção desta doença.

A inibição das proteínas de transdução de sinal das vias que levam à ativação do NF-κB, tem sido utilizada há muitos anos para combater a doença inflamatória e mais recentemente também tem mostrado seu papel benéfico no tratamento do cancro humano.

Na verdade existe uma íntima relação entre a inflamação crónica e o cancro que foi primeiro sugerida por Galeno (180 d.C.) e posteriormente confirmada por Virchow.

A ocorrência de um microambiente inflamatório nos tumores que não estão epidemiologicamente relacionados com a inflamação levantou a questão se os eventos que causam neoplasia genética são responsáveis pela construção de um ambiente inflamatório.

As interações complexas entre carcinogénese e o genoma hospedeiro podem explicar porque somente alguns desenvolvem cancro após a exposição a um carcinogénico conhecido.

Novos aspetos da genética na patogénese do cancro, como a metilação do ADN e os microRNAs são cada vez mais reconhecidos como importantes para o processo.

Em 1970, verificou-se que a TAM promoveu o crescimento do tumor *in vitro* e *in vivo*. Assim, na maioria dos tumores humanos, uma alta frequência de TAM está associada a mau prognóstico [28]. Este achado patológico ressurgiu na era pós-genómica: genes associados com infiltração de leucócitos ou macrófagos (ou seja, CD68) fazem parte de assinaturas moleculares que anunciam mau prognóstico nos linfomas e carcinomas de mama [29]. Do mesmo modo, os polimorfismos funcionais de genes mestres de inflamação (TNF e IL-1) estão associados ao risco de cancro e à sua progressão [30].

Há relatos de que além de imunidade inata, a imunidade humoral, na forma de anticorpos, pode atuar como um sistema de controlo remoto para ativar as reações inflamatórias que promovem a progressão do cancro[31].

1.2.2. Inflamação e doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas (ND) são doenças nas quais há destruição progressiva e irreversível de neurónios causando graves défices a nível funcional, e dependendo do tipo de doença, a perda das capacidades a nível motor, fisiológico e/ou cognitivo. Uma dessas doenças é a doença de Alzheimer, considerada como a principal causa de demência na atualidade (50-60%, em pessoas com idades superiores a 65 anos). A OMS aponta para cerca de 18 milhões de pessoas em todo o mundo e estima, para 2025, números na ordem dos 34 milhões.

As proteínas beta-amiloide ($A\beta$), alfa-sinucleína (α -sin) e prião *scrapie* (PrP^{Sc}) estão envolvidas na etiopatogenia das doenças de Alzheimer (DA) e Parkinson (DP) e nas encefalopatias causadas por Priões, respectivamente, que se caracterizam pela perda de terminais nervosos (sinapses) e de neurónios. Apesar da acumulação anormal destas proteínas ser uma característica comum importante destas ND, os mecanismos moleculares por elas desencadeados, e que estão subjacentes à doença, continuam por esclarecer e a ser alvo de intenso debate.

Os iões metálicos parecem desempenhar um papel importante em várias doenças neurodegenerativas (ND)[32-35].

Evidências sugerem que iões metálicos ligam-se diretamente às proteínas amiloidogénicas causais e modulam a sua agregação em amiloides, considerado um evento-chave na etiologia de doenças ND. Para além desta ligação bem documentada de metais essenciais para proteínas amiloidogénicas, outros iões metálicos (contaminantes ambientais), não essenciais foram considerados como potenciais causadores do desenvolvimento de distúrbios neuronais[36].

Há estudos de revisão sobre o potencial papel de Mn, Pb e Hg como fatores de risco ambiental em doenças ND, que relatam em detalhe disponibilidade desses metais, a sua captação e distribuição no corpo e células, bem como o seu papel na doença de Alzheimer, Parkinson e doenças causadas por priões[37, 38].

Os iões metálicos envolvidos em ND não estão limitados ao Zn, Fe, Cu, Mn. Outros iões, tais como Al, Pb, entre outros, também têm atraído a atenção dos investigadores[39]. Tendo em conta a natureza multifacetada das ND é absolutamente crucial considerar todos os aspectos e todas as disciplinas para o progresso na compreensão da etiologia[40].

A química de metais ligados a péptidos amiloidogénicos ou proteínas relacionadas com as ND, tais como a A β na doença de Alzheimer e α -sin Parkinson não é apenas estudada do ponto de vista químico, mas também biológico e médico.

O papel que os iões metálicos desempenham em várias ND, tornou-se cada vez mais importante, durante as últimas décadas[41]. Isto é particularmente verdadeiro para o Cu e Zn, para a qual foi feito um grande progresso[38].

O papel importante do Fe foi reconhecido mais cedo e, portanto, as abordagens terapêuticas baseadas na interferência com o metabolismo de Fe foram estudados antes daqueles[42]. Isto deveu-se principalmente ao papel do Fe na doença de Parkinson e outras síndromes de Parkinson.

O Pb é um fator ambiental suspeito de contribuir para ND. Em DA, foi postulado que a produção aumentada e/ou redução do metabolismo /depuração do A β , pode levar á deposição de placa amiloide, bem como uma cascata de outras alterações neuropatológicas. Tem sido sugerido que a exposição Pb pode ser associada a AD como os défices de memória e de patologia grave em seres humanos. Assim, tem-se investigado se a exposição de Pb pode induzir a acumulação de A β no cérebro.

Estudos demonstraram que os tratamentos por exposição aguda a Pb levam a níveis aumentados de A β no líquido cefalorraquidiano (LCR) e tecidos cerebrais. Curiosamente, os tratamentos com Pb não afetaram a produção de A β nos neurônios do cérebro. Além disso, os tratamentos levaram a LRP1 a diminuir significativamente a expressão da proteína no plexo coroide. Os resultados sugerem que paragem do transporte LRP1 mediada de A β nesta região, pode ser responsável pela acumulação de A β no cérebro[43].

1.3. O chumbo

O Pb é um elemento cujo símbolo químico Pb deriva da sua designação em latim “*plumbum*”.

Está referenciado no grupo IV-A (metais) da Tabela de Classificação Periódica dos Elementos, tendo o número atómico 82 e uma massa atómica relativa de 207,19.

O Pb pode estar presente no ambiente sob duas formas: inorgânico (sais e Pb metálico), ou orgânico (como, por exemplo, tetraetilo de chumbo).

O Pb por causa de seu baixo ponto de fusão, foi um dos primeiros metais que o homem aprendeu a usar. Foi, provavelmente, isolado logo após os antigos descobrirem o uso do fogo. Há evidências que já era utilizado na Ásia Menor em 4000 a.C. Por ser utilizado de forma tão intensiva e por tão longo tempo, a história de relatos de intoxicação

é extensa. No entanto, foi Hipócrates o primeiro a ligar os sintomas da sua intoxicação ao seu fator causal[44].

Descobertas arqueológicas indicam a presença de Pb em objetos e pigmentos durante o início da Idade do Bronze e do Ferro. No Antigo Egito e na civilização greco-romana o óxido de Pb foi produzido como um subproduto da refinação da prata.

É com a civilização romana que o Pb atinge o primeiro expoente da sua utilização. Além dos usos para o Pb já instituídos, os romanos desenvolveram técnicas de fusão e moldagem de modo a obterem folhas de chumbo. Estas foram usadas nos reservatórios de água e condutas de abastecimento com que os romanos levavam água para as populações. Esta também era usada no fabrico de utensílios domésticos e para revestir os potes de bronze onde eram feitos os cozinhados. Os sais de Pb eram usados pelos romanos e pelos gregos como aditivo do vinho, para o adoçar[45]. Isto resultou em intoxicação entre os ricos e tem sido sugerida como motivo provável para a queda do Império Romano. Vinhos fortificados de Espanha e Portugal, rum das colónias e cidra precipitaram epidemias de envenenamento por chumbo.

A partir da Antiguidade, o uso de Pb diminuiu passando a ter uma conotação negativa por estar associada a rituais fúnebres.

Aos poucos vão-se desvanecendo as ideias negativas sobre o Pb e o seu comércio, a meio da Idade Média, volta a crescer.

Embora seja considerada como uma doença da Revolução Industrial, no fim do século XVIII, o envenenamento por Pb é já documentado há cerca de 6000 anos.

No início do IV século a.C., Hipócrates descreveu com precisão os sintomas de envenenamento por chumbo[46].

Durante a Idade Média, a intoxicação por Pb foi totalmente esquecida e somente no século XVI, apareceu novamente na literatura médica, quando Paracelso descreveu a “doença dos mineiros”.

A primeira descrição moderna de saturnismo foi realizada em 1839 por Tanquerel, com base em 1200 casos. Este estudo foi tão complexo que desde então, pouco foi acrescentado ao seu quadro clínico[47].

Com o desenvolvimento da indústria automóvel no início de 1920s, o chumbo, na forma de compostos orgânicos com propriedades antidetonantes, passou a ser adicionado à gasolina. Este seu uso generalizou-se, sendo que até meados dos anos 70 quase toda a gasolina usada no mundo era aditivada com Pb.

As propriedades terapêuticas do Pb são conhecidas desde a Antiguidade, quando eram usados pós de óxidos de Pb para o tratamento de diarreias, para parar hemorragias e como indutor de abortamentos. Mesmo reconhecendo os efeitos tóxicos causados pelo

chumbo, ele é considerado eficaz no tratamento de algumas doenças, havendo povos mais primitivos e de países menos desenvolvidos que o continuam a usar[48, 49].

Mesmo com amplo conhecimento da sua causa, apresentação clínica e prevenção, esta patologia é comum em todo mundo, principalmente nos países em desenvolvimento.

Os casos atuais de intoxicação são em geral, mais brandos do que os de 50 anos atrás. No entanto, as estatísticas demonstram apenas a ponta do iceberg e geralmente não consideram a intoxicação subclínica[6].

O Pb é virtualmente omnipresente no meio ambiente como resultado de sua ocorrência natural e da sua utilização industrial, aliado ao facto da inexistência de um processo de eliminação natural[50, 51].

A ingestão diária média de um adulto é de 0.1 a 2 mg. Os casos de toxicidade resultam tanto da exposição ambiental quanto da industrial[52]. É considerado uma doença crónica, às vezes com episódios sintomáticos agudos que levam ao efeito crónico irreversível[6, 53].

A maioria das intoxicações por Pb é lenta e gradual devido à sua exposição e acúmulo frequentes[4, 7, 54, 55].

Os compostos inorgânicos apresentam duas vias de absorção:

1. Respiratória: importante via na exposição ocupacional.
2. Digestiva: via predominante.

Apenas os compostos orgânicos conseguem atravessar o organismo por via cutânea, por exemplo, o tetraetilo de chumbo, penetra rapidamente no organismo pelos pulmões, pelo trato gastrointestinal e pela pele.

Pela via respiratória, a absorção depende da forma (fumos metálicos x partículas), da concentração e das variações patológicas e fisiológicas individuais (variabilidade intra e inter-individual)[56].

Aproximadamente 90% das partículas de Pb inaladas do ar ambiente são absorvidas, seja como carbonato de Pb ou por fagocitose.

Estas partículas serão então, depositadas nas regiões nasofaríngea, traqueobrônquica e alveolar, de onde serão eliminadas pelo mecanismo mucociliar da laringe, ou serão engolidas e absorvidas, ou ainda eliminadas pelo trato gastrointestinal (com exceção da região alveolar). A absorção de Pb pelo trato gastrointestinal é de aproximadamente de 10% nos adultos, já que a maior parte do Pb ingerido é excretado, mas o índice de absorção pode chegar a 50% quando ingerido como solução. Nas crianças esta absorção chega a 40% do total do Pb ingerido com os alimentos[57-59].

De salientar que a absorção de Pb pela via digestiva depende principalmente de fatores dietéticos, como o estado de jejum, a ingestão de proteínas e da presença de cálcio, ferro e fósforo[60].

Uma deficiência desses nutrientes aumenta a absorção do Pb e vice-versa, provavelmente pela competição destes minerais por um mesmo mecanismo de transporte.

Estudos demonstram que há uma relação recíproca entre o conteúdo de cálcio da dieta e a absorção do chumbo.

O Pb do sangue representa menos que 2% do Pb total do corpo, dos quais, 90% são ligados a proteínas ou frações destas (hemoglobina e proteínas de baixo peso molecular) e menos de 5% estão localizados no plasma, ligados a albumina, globulina ou como iões livres.

Após a absorção, é distribuído pelo sangue, inicialmente nos tecidos moles, principalmente no epitélio tubular dos rins e fígado, onde parte é excretada na bile, outra é armazenada e uma terceira penetra na circulação na forma de fosfato de chumbo.

Com o tempo, é redistribuído e depositado nos ossos (95%), dentes e cabelo, provavelmente por seguir as vias metabólicas do cálcio.

A deposição nos ossos longos mostra gradientes de concentração relacionados ao tempo de fixação e ao grau de exposição[61]. O Pb do esqueleto é biologicamente inerte, mas sob certas condições (alterações no equilíbrio ácido-base, infecções, cirurgias, uso de determinadas drogas) pode ser rapidamente mobilizado, levando ao reaparecimento de sintomas tóxicos, mesmo após cessação da exposição.

Níveis elevados de Pb também podem ser encontrados na aorta, glândulas suprarrenais, tireóide e jejuno, ultrapassando ainda, a barreira hematoencefálica, contudo é encontrado no cérebro em pequenas concentrações (acumulando-se predominantemente na substância cinzenta e nos gânglios da base)[62, 63].

Pode também atravessar livremente a barreira placentária, igualando os níveis no sangue da mãe e do feto.

O Pb também será rapidamente distribuído entre as estruturas subcelulares, mas ligar-se-á firmemente às mitocôndrias num importante fenómeno de distribuição e toxicidade intracelular.

A retenção nos tecidos moles estabiliza-se na vida adulta e decresce com a idade. Todavia, continua a acumular-se na aorta e nos ossos durante toda a vida. E havendo exposição ocupacional, elevará os seus níveis no fígado, ossos e pulmões.

A excreção dá-se por diversas vias, mas somente a renal e a gastrointestinal são as mais representativas.

Estima-se que pela urina são excretados até 80% do Pb ingerido enquanto que 15% são eliminados pelas fezes via bile e secreção pelo trato gastrointestinal.

As menores vias de excreção são a pele, o suor e a descamação, a queda de cabelos, as unhas e pelo leite materno, representando cerca de 5%. Destes a sudorese possui importância clínica, principalmente em climas quentes, onde a produção de suor é acentuada.

Devemos considerar também a presença do Pb no leite materno nas mulheres em fase de amamentação, pois este pode estar presente em pequenas quantidades, dependendo dos níveis de Pb sanguíneo da mãe[64, 65].

O Pb pode ser encontrado nas fezes em abundância, predominando aquele não absorvido na passagem pelo intestino.

A excreção pela via digestiva ocorre tanto por secreção ativa, como por eliminação passiva pelas glândulas do trato gastrointestinal (salivares, pâncreas e glândulas parietais intestinais), pela descamação do epitélio intestinal e por excreção biliar.

A excreção renal ocorre quase exclusivamente por filtração glomerular. Quando aumenta a ingestão diária em indivíduos saudáveis, há um aumento imediato na secreção pela urina e fezes. A determinação das concentrações do Pb urinário pode ser utilizada como teste de exposição ocupacional ao chumbo[66].

A eliminação do organismo é extremamente lenta, e pode ser dividida em três compartimentos:

1. Sangue e alguns órgãos parenquimatosos que possuem eliminação mais rápida, com semivida biológica de duas a três semanas;
2. Tecidos moles, como a pele e músculos e a medula óssea, possuem eliminação intermediária, com semivida biológica de três semanas;
3. Ossos densos e dentes possuem eliminação muito lenta, com uma semivida biológica de aproximadamente vinte anos.

Na seguinte figura, são retratadas as principais vias de exposição, entrada, transporte, armazenamento e excreção do Pb no organismo humano.

Fig. 1B

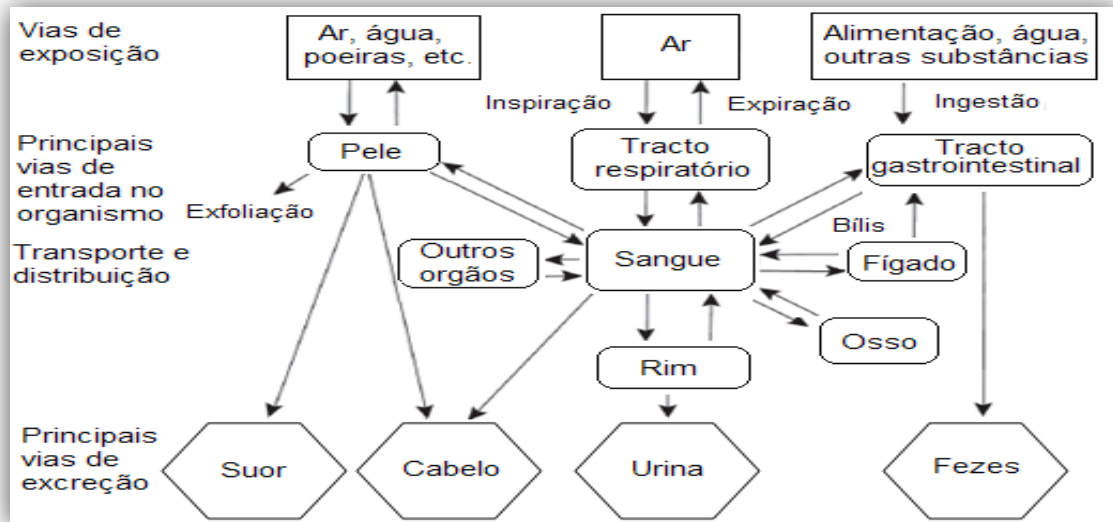


Figura 1B - Principais vias de exposição, entrada, transporte, armazenamento e excreção do Pb no organismo humano.

Relativamente à toxicodinâmica do Pb é fator relevante a reversibilidade das alterações bioquímicas e funcionais induzidas pela sua intoxicação. Esses efeitos são inicialmente devidos a sua interferência com o funcionamento adequado das membranas celulares e das enzimas, causadas pela formação de complexos de Pb e ligações contendo enxofre, fósforo, nitrogénio e oxigénio[67].

O sistema nervoso, a medula óssea e os rins, são os órgãos críticos na exposição ao chumbo.

Alterações no sistema nervoso e desvios da síntese da heme são considerados os efeitos tóxicos[68]. Esta alteração na biossíntese do sangue serve como um indicador metabólico para a detecção precoce de exposição de sua exposição antes do aparecimento dos sintomas clínicos[3].

Os desvios da síntese do heme são considerados resultados da ação tóxica sobre os glóbulos vermelhos e células eritropoiéticas na medula óssea, causando inibição da síntese da hemoglobina, redução do tempo de vida dos eritrócitos e estimulação da eritropoiese.

O Pb inibe o transporte intracelular do ferro e o seu uso nas células eritropoiéticas, aumentando seus níveis nas células, no soro e na urina. O ferro não hemoglobínico (ferritina, hemossiderina) é depositado nos glóbulos vermelhos com mitocôndrias danificadas e fragmentos contendo proteínas de alto peso molecular, além de ARN e polissacarídeos que não são detetados nos glóbulos normais. Estas formações, devido a

presença do ARN podem ser visualizadas por coloração específica para basófilos, chamados de eritrócitos de pontilhado basófilos. Portanto, há um aumento na produção das células vermelhas, evidenciado pelos reticulócitos circulantes e pela hiperplasia de células eritropoiéticas na medula óssea com alterações atípicas (alterações na hemoglobinação, acúmulo do ferro não hemoglobínico e polissacarídeos, retardamento na maturação).

Estes efeitos sobre a medula óssea podem ser indicadores precoces de efeitos similares noutros órgãos, por exemplo, na síntese do citocromo hepático P450, apresentando alterações importantes, principalmente nas crianças que apresentam envenenamento agudo por Pb[67].

Outros efeitos podem ser causados pelo Pb nos eletrólitos (sódio, potássio), no metabolismo mineral (Zn, Co, Mn, Ca, P e Fe), no metabolismo dos lipídeos e carboidratos (inibindo enzimas que contenham-SH), no metabolismo do ADN e ARN, nas vitaminas, na produção de hormonas (tiroxina, hormónio da hipófise, catecolaminas) e no metabolismo dos aminoácidos (triptofano).

De todas as alterações tóxicas produzidas pela intoxicação pelo Pb, a encefalopatia é a mais importante e grave, tanto em adultos, quanto em crianças[62]. A exposição ao Pb pode ter início já na fase intrauterina do feto e continuar aumentando depois do nascimento[69].

A criança poderá apresentar desvios de comportamento, dificuldade de compreensão, baixo Q.I. e retardamento mental[70], sendo frequentes a irritabilidade, o baixo rendimento escolar e a disfunção de percepção sensorio-motora[58].

Este metal não tem nenhuma função fisiológica conhecida mas, devido à exposição permanente, a sua presença no organismo humano é uma constante, exercendo efeitos adversos sobre vários sistemas biológicos. O grau de severidade vai depender, não só do tipo de exposição mas, também, da suscetibilidade individual (determinada por factores genéticos ou condições adquiridas)[56, 71].

Há estudos que apresentam interação entre incidência de cancro e exposição ao chumbo, embora com pouco poder preditivo do risco carcinogénico[10, 53, 72-74].

A Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (*International Agency for Research on Cancer* - IARC) classifica o Pb como um carcinogénio grupo 2B - “possivelmente carcinogénico para o homem”[75].

Um estudo em Inglaterra em trabalhadores expostos ao Pb não verificou um aumento da incidência de cancro (Dingwall-Fordyce and Lane 1963); outro estudo nos EUA verificou um ligeiro aumento no número de mortes por cancro também em trabalhadores expostos ao Pb (Cooper and Gaffey 1975) sendo contudo a maioria dos

tumores encontrados ao nível respiratório e digestivo e não a nível renal. Estudos epidemiológicos relacionaram a exposição ao Pb com cancro pulmonares e cerebrais (Antilla *et al.* 1995; Coco *et al.* 1998). Com base em dados publicados nestes e noutros estudos epidemiológico, pode-se aferir uma ligeira, mas estatisticamente significativa associação entre exposição ocupacional ao Pb e mortalidade por neoplasias de pulmão, estômago e bexiga[76].

Quanto à capacidade do Pb induzir dano genético, os estudos reportam um aumento de alterações cromossómicas, apontando alguns dos potenciais mecanismos de genotoxicidade: (i) Inibição da reparação do ADN; (ii) Capacidade de promoção de células tumorais; (iii) Geração de ROI [56, 77, 78].

Como os iões Pb^{2+} não têm capacidade para gerar radicais hidroxilo a partir do superóxido ou peróxido, o ALA é proposto como agente pro-oxidante no processo de toxicidade do chumbo, sendo que a sua acumulação gera radicais livres de oxigénio[79].

Pesquisas recentes sugerem a importância dos mecanismos epigenéticos na definição da relação entre exposições ambientais e doenças neurodegenerativas. Em estudos epidemiológicos em adultos, a exposição cumulativa ao Pb tem sido associada ao declínio acelerado na cognição. Além disso, a pesquisa em modelos animais sugerem uma associação causal entre a exposição ao Pb durante a infância e a epigenética da doença de Alzheimer[80].

Para entender todas as dinâmicas acima relatadas, e mencionadas em jeito de revisão, é necessário descer a campos básicos fundamentais, no qual tais relatos assentam: a Toxicologia e a regulamentação em contexto médico-legal.

1.4. A toxicologia ocupacional

Por definição, toxicologia, representa a ciência cujo principal objetivo é a identificação e quantificação dos efeitos adversos associados com a exposição a determinados agentes, que se denominam de tóxicos. Estes são normalmente substâncias químicas de origem inorgânica ou orgânica.

A toxicologia compreende o estudo dos tóxicos e das intoxicações, de modo a estabelecer os limites de segurança com que os meios biológicos podem interagir com os tóxicos.

Considera-se a toxicologia moderna constituída por quatro disciplinas principais: *clínica, forense, reguladora e de investigação*. Em função da área de atividade adoptam-se as seguintes subdivisões: *Ecotoxicologia, Toxicologia Alimentar, Toxicologia Clínica, Toxicologia Experimental, Toxicologia Forense, Toxicologia Industrial, Toxicologia dos Medicamentos, Toxicologia Regulamentadora e Toxicologia Ocupacional*.

A toxicologia forense insere-se no âmbito da toxicologia analítica tendo, por conseguinte, como principal objetivo a deteção e quantificação de substâncias tóxicas. Contudo, a atividade do toxicologista forense aplica-se a situações judiciais subjacentes, para as quais importa reconhecer, identificar e quantificar o risco relativo da exposição humana a agentes tóxicos. Como tal aproveita conhecimentos alcançados em praticamente todas as áreas da toxicologia moderna.

Até ao século XX, a toxicologia forense limitava-se a estabelecer a origem tóxica de um determinado crime; o “toxicologista” atuava diretamente no cadáver com a mera intenção da pesquisa e identificação do tóxico. Atualmente o campo de ação desta ciência é mais vasto, estendendo-se desde as perícias no ser vivo e no cadáver até circunstâncias de saúde pública, tais como aspectos da investigação a nível da atividade laboral ou do meio ambiente. E aqui faz-se a ponte para a toxicologia ocupacional.

Os exames no ser vivo têm como objectivo a avaliação da intoxicação como circunstância qualificadora de delito, como causa de perigosidade ou de inimputabilidade.

Em caso de morte por intoxicação que se enquadra no âmbito da morte violenta, existe obrigatoriedade de, nesta suspeita, se proceder à autópsia médico-legal (Decreto-Lei nº 96/01, de 26/03), e consequentemente, em geral, à requisição de perícia toxicológica.

As intoxicações podem ser criminais, legais (pena de morte), acidentais (alimentares, mordedura de animais, absorção acidental, medicamentosas) ou voluntárias (lesões auto infligidas, toxicodependência, terapêutica).

Distinguem-se três formas de intoxicação segundo a velocidade de desencadeamento de ações ou dos efeitos tóxicos: intoxicação aguda, subaguda e crónica.

Os tóxicos podem atuar sobre a célula produzindo uma destruição global da mesma por processos de necrose, ou sobre o sistema enzimático ou partes seletivas da célula (membranas, estruturas endocelulares ou organelos celulares).

A resposta do organismo a um determinado tóxico depende, para além dos factores do “hospedeiro”, da sua concentração no órgão alvo (órgão mais acessível ou mais sensível aos efeitos após exposição) e do seu mecanismo de ação. Há portanto que determinar a relação entre exposição, dose e resposta. Como tal, é importante conhecer a cinética das substâncias no organismo. As principais fases em toxicocinética são absorção, distribuição, metabolização e eliminação.

Cada um destes passos pode influenciar a extensão da toxicidade produzida pelo agente tóxico, pelo que uma avaliação do ponto de vista da toxicocinética pode ser importante na apreciação dos dados analíticos obtidos.

Em toxicologia, o processo de metabolização (ou biotransformação) assume especial interesse, dado que os tóxicos são geralmente agentes xenobióticos, portanto particularmente susceptíveis a sofrer alterações metabólicas no organismo, o que pode resultar na produção de novas substâncias designadas por metabolitos.

Como factores do hospedeiro que afetam muitas das respostas a diversos tipos de agentes tóxicos podemos considerar as determinantes genéticas, idade, género, e outros tais como dieta ou coexistência de doença infecciosa. Estes fatores podem afetar a exposição e a dose, através de alterações na absorção, distribuição ou metabolismo. A variabilidade nas populações humanas e no indivíduo deve ser considerada na avaliação de riscos da exposição a tóxicos e na ponderação de testes e estudos de investigação toxicológica em organismos não humanos. As diferentes intoxicações humanas apresentam geralmente um quadro sintomatológico comum, que por isso associa um conjunto de sintomas tóxicos inespecíficos. Os sintomas mais frequentes e de pior prognóstico para a recuperação do intoxicado são os seguintes: comas, síndromas hepatotóxicos, nefrotóxicos, cardiovasculares, respiratórios e hematológicos, neuropatias periféricas de origem tóxica e síndromes dermatológicas.

Este ramo da toxicologia, ligado às intoxicações profissionais, (exposição a metais pesados, como o Pb), abrangendo o manuseamento de tóxicos, desde a indústria extrativa passando pela transformadora até à fase final que inclui a manipulação e utilização destes produtos, surge após a revolução industrial.

Cada vez mais a medicina atual adquire um carácter social principalmente na proteção e prevenção, da importância do trabalho como procedência de doenças e acidentes que ameaçam a saúde dos trabalhadores.

1.5. A medicina do trabalho

A medicina do trabalho define-se como *a ciência que tende a olhar pela segurança do homem e a sua finalidade consiste em melhorar as condições de trabalho, vigiar a saúde dos trabalhadores, protege-los contra perigos de produção, melhorar o seu rendimento, colocá-los num ponto adequado e levar a cabo a redução e adaptação no caso em que seja necessário.*

Hipócrates (460-377 a.C.) alertou para os efeitos nocivos que a expansão dos vapores de Pb tinha sobre a saúde dos mineiros e dos operários que o manuseavam. Mas é a partir do séc. XV é que começaram a existir progressos significativos no campo da medicina do trabalho [15].

Em 1473 Ellenberg depois de reconhecer a perigosidade dos vapores de certos metais e de descrever os sintomas de intoxicação por Pb sugere o uso de máscara e de

luvas. Paracelso (1493-1541) publicou um tratado de doenças profissionais no qual descrevia as várias enfermidades provocadas nos mineiros que manuseavam estes metais.

Ramazzini (1633-1714), com a publicação da célebre *De Morbis Artificum Industriae*, descreve uma série de trabalhos com perigos inerentes, através da observação insistindo e recomendando que as medidas no combate às doenças profissionais tinham um carácter preventivo e não terapêutico, levando a exata valoração do papel patogénico do trabalho [15].

Encara-se como doença profissional aquela que tem origem no exercício do trabalho, em que os mesmos sintomas sejam observados nos outros trabalhadores que exercem a mesma profissão, em que se possa demonstrar com clareza a causa produtiva da síndrome clínica e que haja possibilidade de reproduzir experimentalmente a doença.

Pode-se referir que dentro da medicina do trabalho há lugar à existência da medicina legal, laboral, que visa a junção dos conhecimentos médicos e legais auxiliando a justiça quer em situações laborais quer sociais.

Desde 1970, o Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional, atual ACT (Autoridade para as condições do trabalho), têm monitorizado o ambiente e reduzido significativamente a exposição a metais pesados nomeadamente ao Pb no ar, água e alimentos.

Relativamente ao metal pesado em estudo neste trabalho, na legislação portuguesa o DL nº 274/89 de 21 de Agosto, estabelece diversas medidas de proteção da saúde dos trabalhadores contra os riscos de exposição ao Pb (transpõe a Diretiva nº 82/605/CE de 28 de Julho).

Estabelece também que o Valor Limite de Concentração de Pb no ar no local de trabalho é de 150µg/m³, referido a 8 horas diárias e 40 horas por semana.

O Valor Limite Biológico, ou a concentração de Pb no sangue está fixado em 70µg deste metal por 100ml de sangue.

1.6. A tabela nacional de incapacidades

No direito laboral avalia-se a incapacidade de trabalho que resultou de acidente de trabalho ou doença profissional que originou perda de capacidade.

No âmbito do direito civil, valoriza-se percentualmente a incapacidade permanente em geral, ou seja, a incapacidade para os atos e gestos correntes do dia-a-dia, assinalando depois e suplementarmente o seu reflexo na atividade profissional específica do examinando. Isto permitiu a criação de um instrumento adequado de avaliação neste

domínio específico do direito, destinada a avaliação e pontuação das incapacidades resultantes das alterações na integridade psicofísica – a TNI.

A TNI foi legislada pela primeira vez em Portugal pelo DL n.º 341/93 e visa facilitar a avaliação de lesões físicas ou psicológicas nos trabalhadores como resultado da sua ocupação profissional, ao mesmo tempo que fornece as bases de avaliação do prejuízo funcional sofrido em consequência de acidente de trabalho e doença profissional, com perda de capacidade de ganho, tal como consta no DL n.º 352/2007, DR n.º 204, Série I de 23 de Outubro.

Neste diploma foram publicadas duas tabelas de avaliação de incapacidades, uma destinada a proteger os trabalhadores no domínio particular da sua atividade, portanto no âmbito do direito laboral (Tabela Nacional de Incapacidades por Acidentes de Trabalho e Doenças Profissionais, revista e atualizada), e outra direcionada para a reparação do dano em direito civil (Tabela Nacional para a Avaliação de Incapacidades Permanentes em Direito Civil - DL n.º 352/2007, DR n.º 204, Série I de 2007-10-23).

A TNI atualmente em vigor para o direito civil destina-se a ser utilizada exclusivamente por médicos especialistas em medicina legal ou médicos especialistas noutras áreas com competência específica na avaliação do dano corporal.

Nesta sequência pode dizer-se que o referido decreto veio permitir uma adequada avaliação da incapacidade considerando o sinistrado num todo físico e psíquico, deixando de o considerar apenas pela função exercida.

A medicina legal assume cada vez mais um papel social.

1.7. A medicina legal e o seu carácter social

A medicina legal inclui um amplo leque de serviços localizados na interface entre a prática científica e o direito, situando-se, atualmente, no âmbito da medicina social.

No passado, a medicina legal, apesar de integrar o currículo escolar das escolas médicas restringia-se apenas à tanatologia.

Na verdade, ao longo da história, sempre foi atribuído aos médicos o papel de prestar cuidados de saúde às pessoas doentes ou traumatizadas sem que se valorizassem certos aspectos fundamentais de natureza legal.

Grandes mudanças se operaram no último século na nossa sociedade, vindo alterar a abrangência da medicina legal e restantes ciências forenses, nomeadamente no que se refere ao seu papel social. Entre estas mudanças destacam-se:

- (i) O aumento da violência voluntária (agressões, crimes sexuais) e involuntária (acidentes);

- (ii) O desenvolvimento da ciência médica, quer a nível dos cuidados de emergência, quer a nível tecnológico;
- (iii) A noção mais abrangente de saúde e do papel social do médico e da medicina, registando-se alterações importantes no âmbito da reinserção social e dos modelos de atuação;
- (iv) O posicionamento do direito e da lei face à tomada de consciência sobre os direitos humanos;
- (v) O alargamento dos cuidados de saúde a toda a população e a extensão desses cuidados não só às ações assistenciais curativas ou paliativas mas, também, às ações de prevenção.

Estes e outros factos têm levado a que os médicos, bem como outros profissionais, sobretudo das ciências biológicas, sejam, cada vez mais, chamados a examinar e a pronunciar-se sobre situações variadas e por vezes de grande complexidade, relacionadas com questões de direito, seja do âmbito penal, civil, do trabalho, administrativo ou da família e menores. Estas situações podem incluir, por exemplo a pesquisa de tóxicos em amostras biológicas, entre outros.

Esta variedade de temas levou à necessidade de considerar a medicina legal como uma especialidade, capaz de formar e habilitar profissionais para o cumprimento de tarefas que exigem, além de conhecimentos e capacidades técnicas muito específicas, um grande rigor científico, uma atualização permanente e uma elevada capacidade de isenção e imparcialidade, de forma a não colocar em risco o interesse público, os direitos individuais e, portanto, a justiça.

Trata-se de uma ciência em constante expansão, o que implica que as suas matérias e métodos se adaptem às novas tecnologias, às descobertas científicas e, também, às mudanças sociais e do direito.

Desta forma, considera-se que compete à medicina legal, como ciência social, não só no diagnóstico do caso mas, também, à contribuição para a “terapêutica” das situações e, sobretudo, para a sua prevenção e reabilitação/reintegração/reinserção.

CAPÍTULO 2

2. Objetivos e justificação do estudo

O principal objetivo desta dissertação foi entender a interação do Pb, um dos metais contemplados na TNI, com a inflamação, demonstrando com base no modelo experimental realizado, a importância médico-legal deste metal como agente causal de doença profissional.

Para tal recorreu-se à metodologia de alta resolução, a microscopia electrónica de varrimento acoplada à microanálise por raio-X (SEM-XRM), já utilizada em estudos semelhantes, com outros metais, tais como Hg [81], para investigar a localização e a organização ultraestrutural das micropartículas em circulação.

A razão principal desta investigação é atribuída à contaminação do meio ambiente e consequentemente da cadeia alimentar pelo Pb.

O Pb é um metal de ocorrência natural que com a Revolução Industrial passou a ser usado em grande escala, provocando a libertação de grandes quantidades para o ambiente. Dado o facto de não sofrer qualquer forma de eliminação natural, tem por isso uma grande capacidade poluente.

O Pb é tóxico, trata-se de um dos mais perigosos entre os metais pesados e em moderados níveis de exposição pode causar manifestações neurotóxicas, ao nível da medula óssea e rins, provocando alterações da autoimunidade e diminuição da resistência do hospedeiro a infecções.

As questões principais propostas nesta dissertação foram:

1. A validade da técnica SEM-XRM utilizada, aliada ao interesse médico-legal.
2. Verificar se a toxicidade do Pb esta aumentada ou diminuída na inflamação.
3. Corroborar o que está descrito na literatura sobre o Pb e estados inflamatórios.
4. Extrapolar as possíveis consequências, a nível celular, dos efeitos agudos da imunotoxicidade induzida pela ingestão de Pb.

Finalmente, deve ser notado que os relatos constantes a resultados de diferentes trabalhos, que envolvem não são o Pb, mas também outros metais apresentados ao longo desta dissertação, com especial foco nesta questão 4, serão discutidos de um modo integrado no capítulo 4, em conjunto com as principais conclusões deste trabalho.

2.1. Material e métodos

2.1.1. Ensaios *in vivo* - Modelo animal

Estudos realizados com 48 ratinhos BALB/c, fêmeas de 6 a 8 semanas de idade, de 25g (*Charles River Laboratories* SA, Spain).

Os animais foram mantidos em gaiolas, com ração, água e maravalha devidamente autoclavadas e tratados de acordo com o regulamentado pela Lei Europeia de proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos (diretiva 86/609/EC).

Em metade dos ratinhos foi induzida a inflamação através da formação de uma bolsa de ar subcutânea, enquanto que nos restantes a inflamação a que foram submetidos foi peritoneal. Cada grupo experimental foi composto por 6 ratinhos. O grupo controlo composto por 4 ratinhos.

Nota: A linhagem BALB/c apresenta produção de plasmocitomas em resposta a injeção de óleo mineral com consequente produção de anticorpos monoclonais contra este. É muito utilizada em pesquisas do sistema imune por apresentar um perfil de citocinas de padrão Th2. Foi utilizado um modelo animal de inflamação que consiste na formação de uma bolsa de ar subcutânea. O estudo foi mais direcionado para a resposta aguda inicial, tanto inflamatória como imunotóxica.

2.2. Procedimento experimental

2.2.1 Indução da Inflamação

Os animais foram injetados com uma solução de 500µL de uma solução de BSA (*bovine serum albumin*) a 3% em PBS. Esta injeção foi feita em 24 ratinhos, na cavidade peritoneal.

Na zona subcutânea (restantes 24 ratinhos) foi feita uma injeção de 500µL de ar na região dorsal do ratinho para formação de uma bolsa de ar. Após injeção e decorridos 5 dias foi feita uma segunda injeção com mais 300µL de ar.

A injeção de BSA deu-se 24 horas após esta 2ª injeção de ar no outro grupo de animais, para criar “ambiente” inflamatório, maior avidez de neutrófilos.

O sacrifício dos animais deu-se posteriormente com uma injeção letal de cloreto de Pb a 5% (500µL) na cavidade peritoneal e na bolsa de ar subcutânea.

Os exsudados celulares foram recolhidos e ressuspensos, por lavagem com solução de PBS.

Posteriormente prepararam-se lâminas citológicas dos exsudados (citocentrífuga). Estas preparações foram usadas para a quantificação de tipos de células por microscopia electrónica de varrimento (SEM).

2.2.2. Técnica SEM-XRM

A técnica utilizada foi a microscopia electrónica de varrimento acoplada à microanálise por raio X (SEM-XRM).

O grande avanço na caracterização de materiais com recurso a esta metodologia ocorreu na década de 50, com a comercialização do primeiro SEM em Cambridge (1965). Em 1982 foi instalado o primeiro SEM em Portugal, no Centro de Metalurgia e Ciência de Materiais da Universidade do Porto.

A esta técnica está geralmente associada a técnica de espectroscopia dispersiva de Raios-X (EDS), que permite uma análise semi-quantitativa dos elementos químicos na superfície dos materiais.

Os resultados obtidos durante a realização desta dissertação de mestrado foram realizados num microscópio convencional, modelo JEOL-6301F SEM acoplado a um sistema de detecção *Noran Voyager* de microanálise elementar de raio-X com sistema de detecção EDS, do Centro de Materiais da Universidade do Porto (CEMUP)[82].

As amostras foram revestidas com uma fina película de Carbono (C), de forma a tornar a superfície condutora, possibilitando desta forma o estudo por microscopia electrónica.

Esta técnica, fácil e pouco dispendiosa, qualitativa e semi-quantitativa do conteúdo químico, permite observação e caracterização de grandes superfícies de amostras espessas.

Os microscópios electrónicos são instrumentos que permitem o exame e obtenção de imagens de amostras de materiais diversificados, semelhantes às que se podem obter por microscopia óptica de reflexão, mas numa gama de ampliação superior (desde 10x até 18000x), com uma profundidade de campo de 30µm, tendo como base as radiações resultantes da incidência de um feixe de electrões num ponto da superfície da amostra-alvo, e a subsequente recolha dos sinais electrónicos emitidos pelo material-alvo.

As amostras para poderem ser caracterizadas por microscopia electrónica têm de obedecer às seguintes condições:

- (a) Apresentar boa condutividade eléctrica superficial;
- (b) Ausência de condutividade superficial, pois leva à necessidade de metalização, através da aplicação de um revestimento ultrafino, de Au ou C; (neste trabalho foi utilizado o C devido à sobreposição nos espectros dos picos de Pb com o Au);

- (c) Suportar o vácuo (pressão de 10^4 Pa);
- (d) Estabilidade física e química, nas condições de interação com o feixe electromagnético.

As amostras são percorridas sequencialmente (varrimento) por um feixe de eletrões acelerados por uma tensão que varia entre 0 e 40KV, finamente focado através de um sistema de lentes electromagnéticas.

Da interação do feixe electrónico com a amostra resulta a emissão de diversos tipos de radiação e eletrões, entre os quais os eletrões secundários (ES) utilizados na formulação da imagem da amostra ($E < 50\text{eV}$). Os eletrões secundários são eletrões da amostra que sofrem excitação e “escapam-se” da superfície. Os eletrões retrodifundidos (ER) permitem a distinção, na amostra em estudo, de regiões de átomos leves e pesados.

A análise simultânea dos sinais recolhidos pelos detectores permite caracterizar cada ponto da amostra em termos de: topografia (ES e ER); número atómico (ER); propriedades cristalinas (ER); composição química elementar (ER); campos magnéticos (ER); orientação cristalina local da amostra (ER)[83].

Fig. 2A

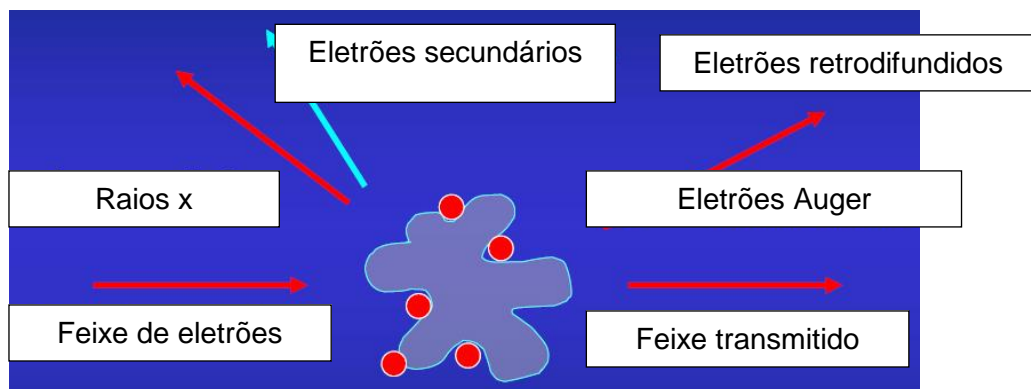


Figura 2A: Tipos de radiação emitida por uma amostra quando submetida a um feixe de eletrões. Adaptado de Raven *et al.*, 1996.

Esta informação, quer seja de topografia ou de composição elementar, requer para a sua visualização e interpretação que ao microscópio esteja associado o espectrómetro de raios X. Torna-se assim possível, com as imagens de eletrões secundários (imagens que se assemelham às imagens habituais da observação visual), ter uma interpretação intuitiva das superfícies celulares, sendo depois na imagem de eletrões retrodifundidos visualizado o contraste topográfico e aplicada a microanálise, para determinar o conteúdo no interior das células.

O sistema EDS de deteção acoplado ao microscópio utilizado neste estudo permite a deteção de elementos químicos presentes numa concentração superior a 0,2-0,3% em massa, conseguindo-se uma microanálise qualitativa e semi-quantitativa dos elementos presentes na amostra.

A conjugação das técnicas SEM/EDS permite obter imagens tridimensionais da amostra e mapas de composição dos elementos à superfície da amostra.

CAPÍTULO 3

3. Resultados

As experiências preliminares foram realizadas com o objetivo de obtenção de cavidades inflamatórias em que o tipo de leucócitos predominante fosse o de neutrófilos ou macrófagos.

A estratégia escolhida consistiu em usar o mesmo agente flogístico - BSA - para provocar nas duas cavidades (com o mesmo intervalo de tempo, 72 horas após a injeção de BSA), onde os exsudados de neutrófilos ou macrófagos prevaleceu.

Após 72 horas da injeção de BSA, macrófagos foram o tipo de célula predominante na cavidade peritoneal, enquanto os neutrófilos foram o tipo celular mais numerosos que foi colhida a partir da bolsa de ar subcutânea.

Do conjunto de imagens obtidas no estudo, seguidamente apresentam-se as mais representativas, e que retratam os eletrões secundários e eletrodifundidos de células inflamatórias com um curto intervalo de tempo de exposição a Pb, isto é, a distribuição de pontos de Pb por fagócitos.

Fig. 3A

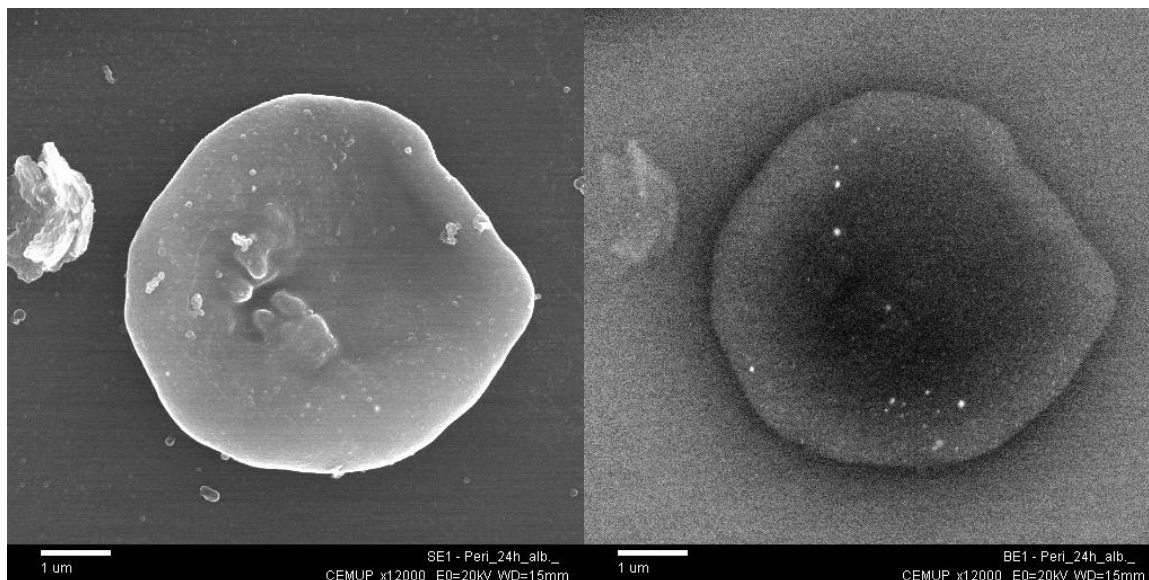


Figura 3A – Imagens de eletrões secundários (à esquerda) e de eletrões retrodifundidos (à direita) de uma célula inflamatória peritoneal, após 24 horas.

Fig. 3B

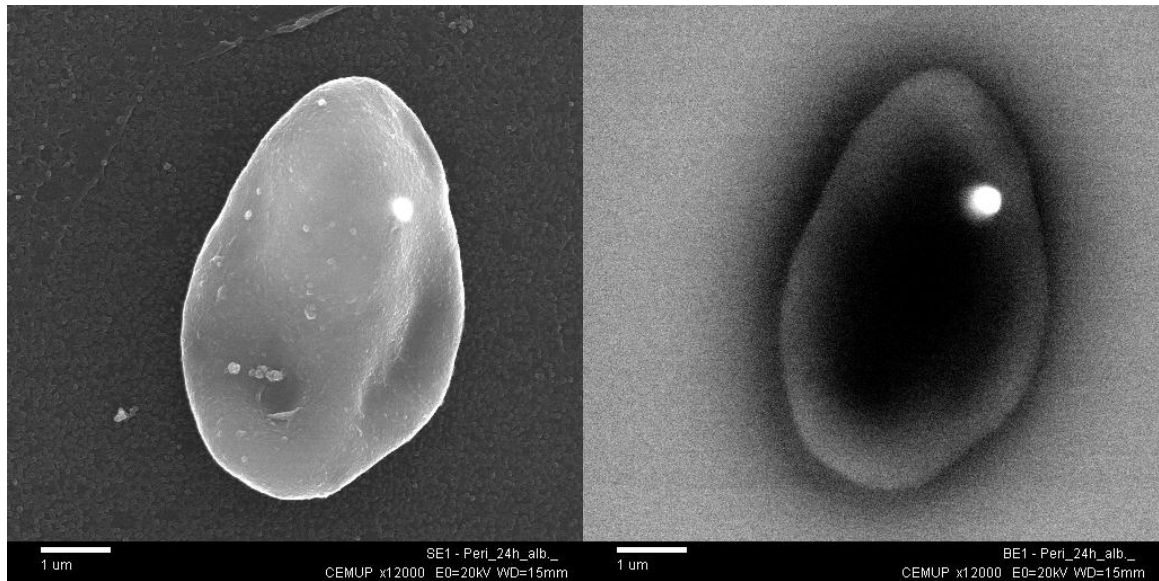


Figura 3B - Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de uma célula inflamatória peritoneal, após 24 horas.

Fig. 3C

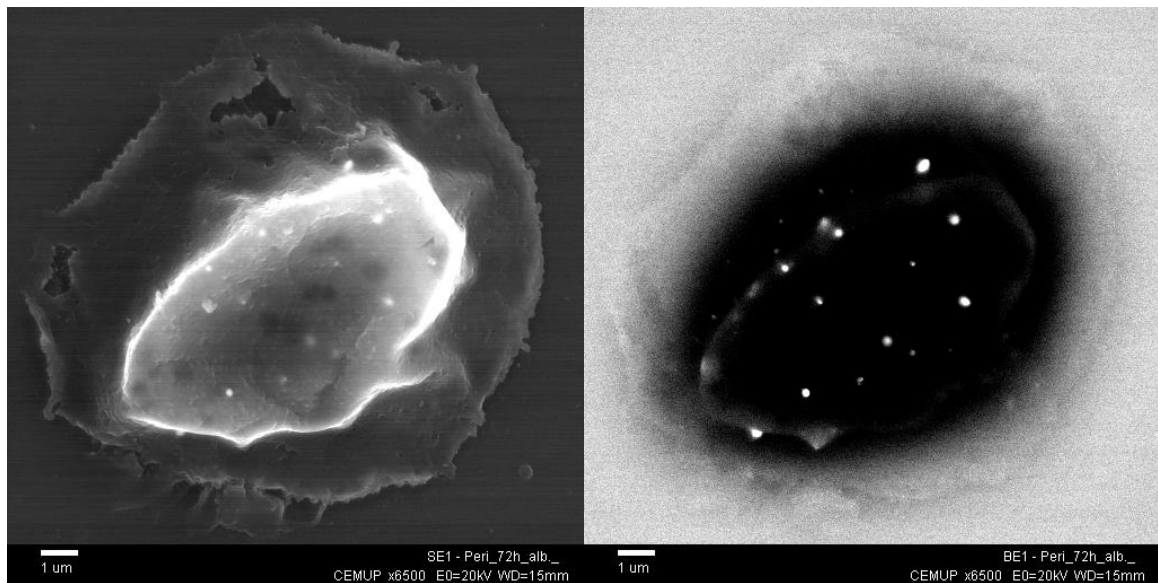


Figura 3C - Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de uma célula inflamatória peritoneal, após 72 horas.

Fig. 3D

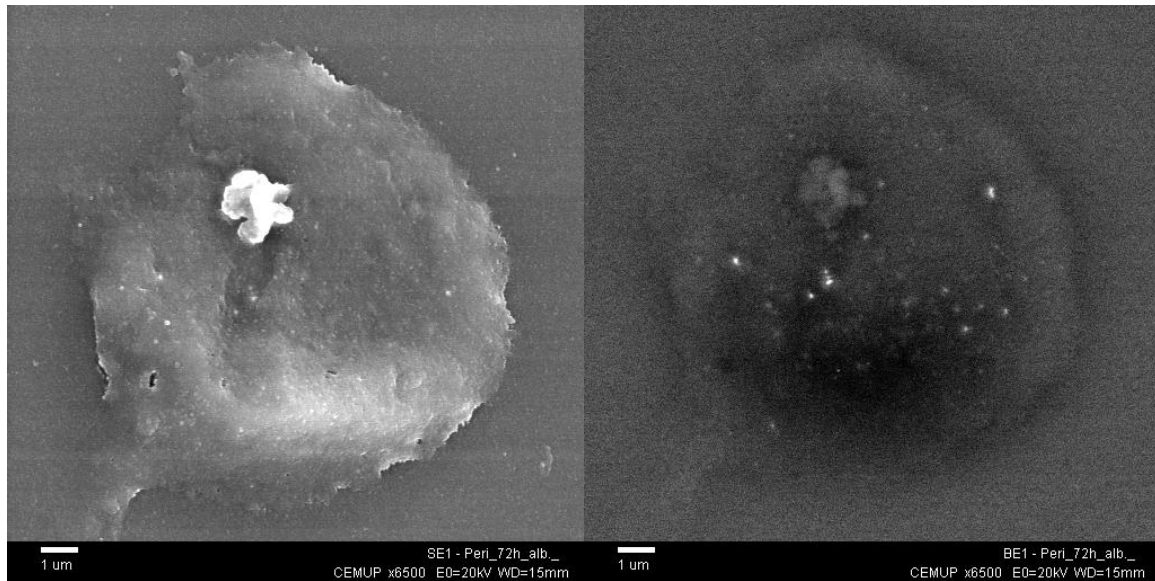


Figura 3D - Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de uma célula inflamatória peritoneal, após 72 horas.

Fig. 3E

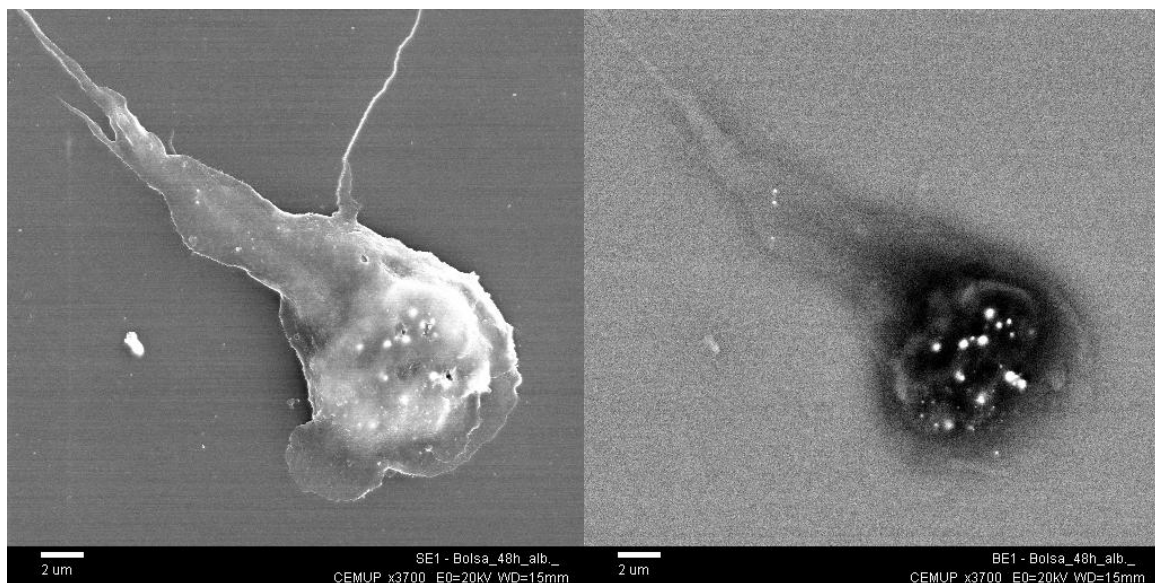


Figura 3E – Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de uma célula inflamatória de bolsa de ar subcutânea, após 48 horas.

Fig. 3F

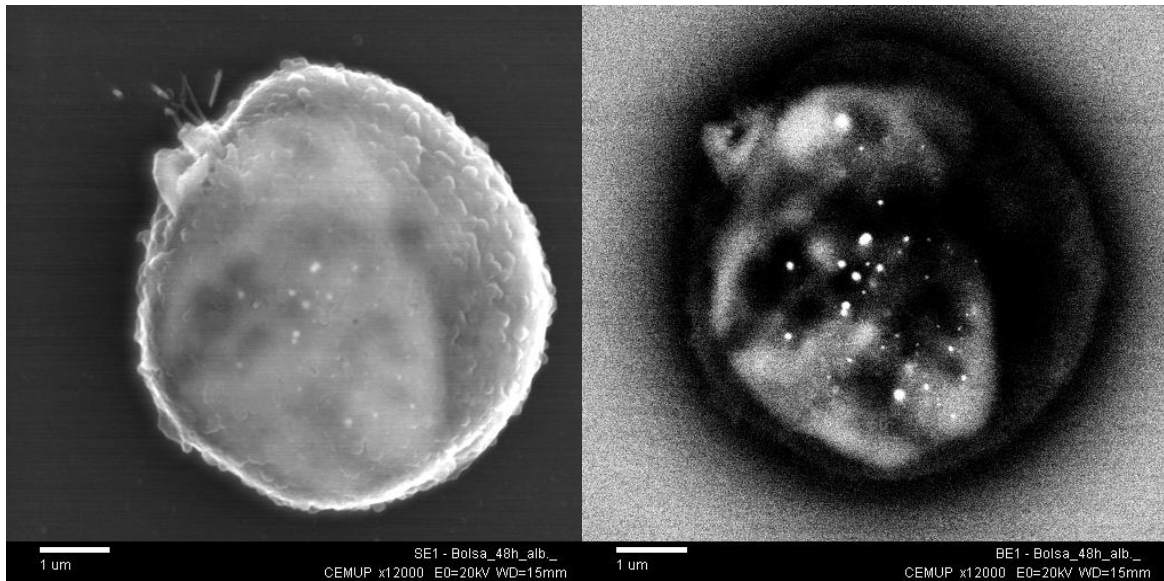


Figura 3F - Imagens de elétrons secundários (à esquerda) e de elétrons retrodifundidos (à direita) de uma célula inflamatória da bolsa de ar subcutânea, após 48 horas.

A distribuição subcelular de Pb mostrou que as partículas de metal estavam espalhadas por todo o citoplasma, sem organização aparente em padrões (Figuras 3A-3F).

Após 72 horas de inflamação, as células fagocitárias mostraram uma diferença significativa na positividade relativamente ao Pb entre as duas cavidades: as células inflamatórias da cavidade peritoneal (tendo um número quase igual de neutrófilos e macrófagos) ingeriram três vezes mais Pb do que a população predominante macrofágica presente, no mesmo intervalo de tempo da inflamação, na bolsa de ar subcutânea.

Uma grande variação no número de pontos de Pb foi encontrada entre os fagócitos inflamatórios individuais.

Partículas de Pb foram excluídas de regiões nucleares. A maioria das partículas de Pb visualizadas dentro de fagócitos inflamatórios são redondos e com diâmetros menores do que 20nm.

A SEM-XRM oferece a identificação *in situ* de pontos de Pb individuais nos fagócitos. Este permite a quantificação assim como também permite definir a sua topografia.

As figuras seguintes representam alguns dos espectros de SEM-XRM obtidos, dos pontos assinalados nas imagens, de elétrons retrodifundidos (ER), e demonstram a presença qualitativa de Pb em concentrações superiores a 0,2% (m/m).

Fig. 3G

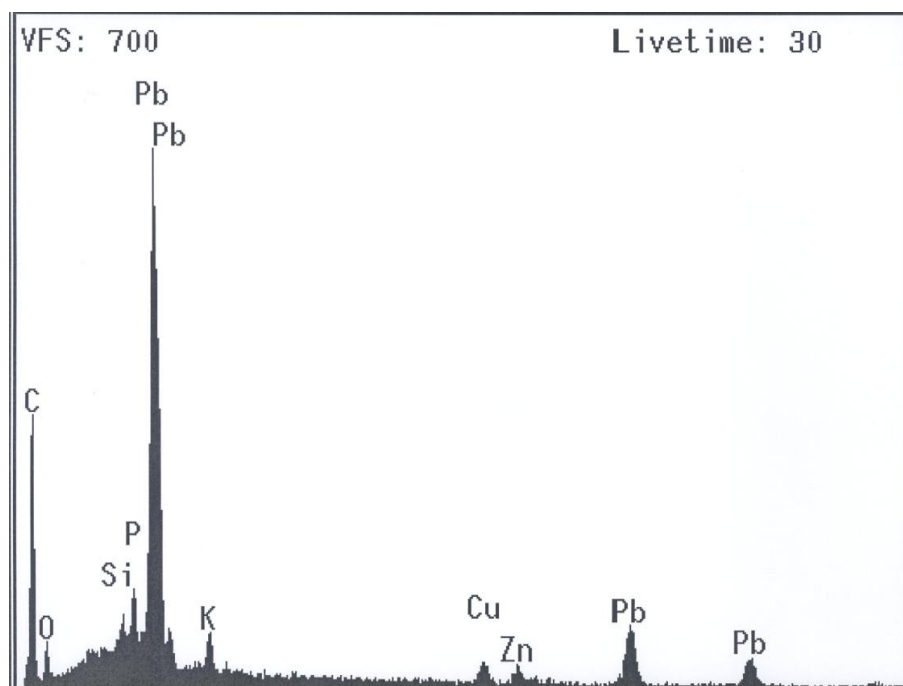


Figura 3G - Espectro de SEM-XRM dos pontos (ER) assinalados numa célula inflamatória peritoneal.

Fig. 3H

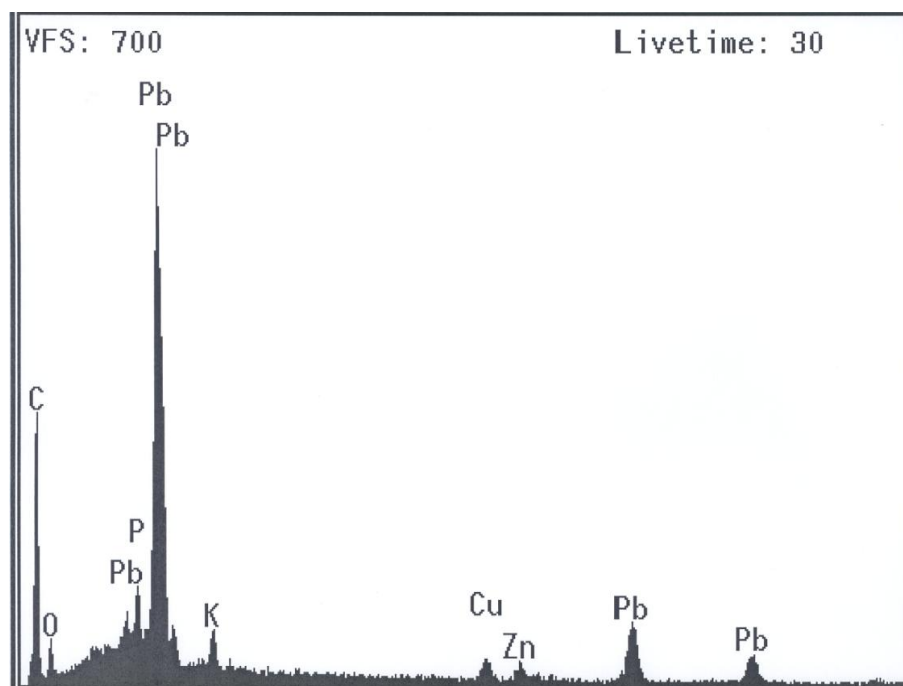


Figura 3H - Espectro de SEM-XRM dos pontos (ER) assinalados numa célula inflamatória peritoneal.

Fig. 3I

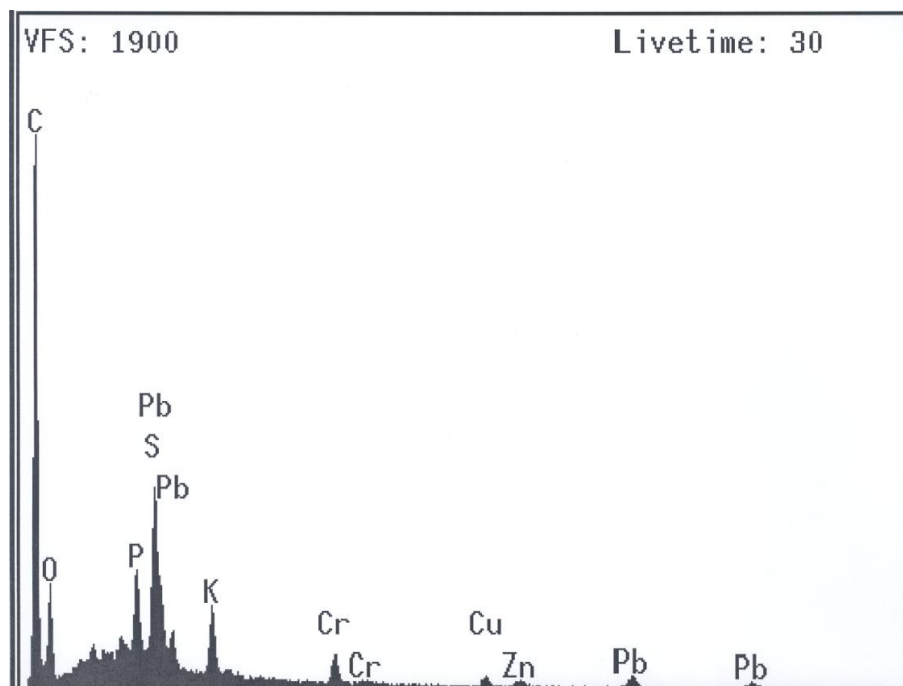


Figura 3I - Espectro de SEM-XRM dos pontos (ER) assinalados numa célula inflamatória da bolsa de área subcutânea.

Fig. 3J

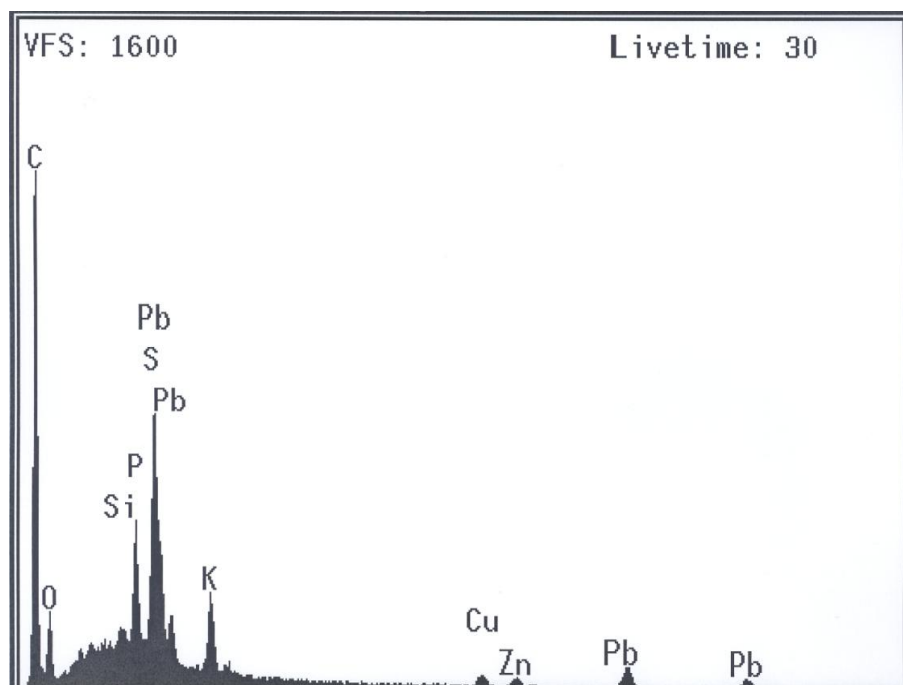


Figura 3J - Espectro de SEM-XRM dos pontos (ER) assinalados numa célula inflamatória da bolsa de área subcutânea.

CAPÍTULO 4

4. Discussão

As conclusões deste trabalho evidenciam resultados válidos na análise estrutural, demonstrando a aplicabilidade da técnica escolhida (SEM-XRM) aliado ao interesse médico-legal: dado o facto de o Pb ser um dos três metais contemplados na TNI, por ser considerado um motor de morbilidade.

O método de alta resolução de SEM-XRM permite a quantificação de células positivas de Pb, bem como a avaliação do tamanho e do número de pontos de Pb observados em cada célula.

Os resultados mostram uma absorção rápida de Pb pelos fagócitos inflamatórios, ou seja, os macrófagos e granulócitos.

Um curto período de exposição *in vivo* ao Pb é suficiente para que haja uma ingestão de um grande número de pontos de Pb pelos fagócitos individuais.

A inflamação aumenta a capacidade dos fagócitos para captar partículas de Pb, resultados que vem corroborar o que tem vindo a ser descrito na literatura.

A revisão da literatura exposta anteriormente demonstra que leucócitos e macrófagos são componentes celulares frequentemente encontrados em lesões inflamatórias.

Em virtude da ampla gama de substâncias pró-inflamatórias e pró-reparo tecidual produzidas por estas células, acredita-se que elas tenham papel fundamental na formação, perpetuação e involução das lesões inflamatórias, muito embora os mecanismos exatos por meio dos quais estes fenómenos ocorrem não estejam completamente esclarecidos.

A toxicidade do Pb é conhecida por estar relacionada com a suscetibilidade individual.

Um estudo feito por Church, *et al.*, onde dois trabalhadores expostos foram comparados: um assintomático (A), e o outro que apresentava sintomas de toxicidade (B), demonstrou que no primeiro a maior parte (cerca de 70 %) do Pb dos eritrócitos foi associada à proteína metalotioneína, enquanto no outro a proteína continha apenas cerca de 20 % do total de Pb, com quantidades significativas ligados a proteínas de elevado peso molecular, incluindo a hemoglobina. Estes resultados sugerem que esta proteína pode atuar para sequestrar chumbo numa forma não biodisponível, protegendo, portanto, o corpo da toxicidade do chumbo[84].

Ana Moreira (2010) na sua tese de mestrado sobre a *frequência dos polimorfismos genéticos ALAD (MspI) e VDR (BsmI), envolvidos na toxicocinética do Chumbo*, numa *população portuguesa*, refere a importância da avaliação do potencial efeito dos genótipos estudados sobre dois biomarcadores, um de exposição e outro de efeito. A enzima ALAD parece ter um papel determinante na acumulação e distribuição do metal pelo organismo, o que por sua vez, influencia os efeitos patológicos do chumbo. Quanto ao polimorfismo *BsmI* do gene *VDR*, observou que os portadores do alelo *VDR B* são os que possuem níveis mais elevados de ambos os biomarcadores[85].

A maior parte dos estudos incidem na população ocupacionalmente exposta, havendo poucos dados sobre exposição ambiental. Os trabalhadores expostos poderão estar mais sensibilizados/predispostos por “fatores” vários, entre os quais a inflamação.

No entanto, são necessários mais estudos para se avaliar os efeitos provocados por estes “fatores” na toxicocinética do chumbo e quais os mecanismos através dos quais a sua influência se faz sentir.

Há falta de biomarcadores validados da exposição ao Pb. Estudos futuros que utilizem um desenho de coorte para medir a exposição ao Pb e biomarcadores de carga validados em epigenética serão úteis para esclarecer esta relação importante.[5]

Existem vários desafios para a investigação epidemiológica humana, avaliando a relação entre a epigenética, a exposição ao Pb e doença.

Macrófagos associados a tumores têm um papel importante na resposta inflamatória e produzem uma série de fatores de crescimento para células epiteliais e endoteliais, bem como das citocinas inflamatórias e quimiocinas, que contribuem para a sobrevivência do tumor, proliferação e invasão.

Da revisão da literatura ressalta que existe uma íntima relação entre a inflamação crónica e o cancro e que as lesões cancerígenas aproveitam o desequilíbrio do mecanismo natural de defesa, para invadir o organismo e levá-lo à morte.

Os mediadores químicos da inflamação, fazem assim jogo duplo, desempenhando papel nocivo no aparecimento e desenvolvimento das lesões cancerígenas e o excesso da produção de mediadores da inflamação produzido pelas células cancerígenas, acarretam o bloqueio do suicídio celular (apoptose) geneticamente programado.

A doença neurológica consiste numa degeneração generalizada das células nervosas que transmitem os impulsos eléctricos necessários para o bom funcionamento do organismo.

A DA é uma desordem neurodegenerativa lenta e progressiva que afeta o cérebro e se encontra associada à idade e é caracterizada pela toxicidade induzida pela

deposição de formas anormais de proteínas, tal como descrito no capítulo 1. O curso médio da DA é de cerca de 10 anos. É considerada um problema de saúde pública. Os doentes que sofrem desta desordem não são considerados responsáveis pelos seus atos, devido ao permanente afastamento da realidade e incapacidade de perceber as situações à sua volta. Pelo Código Penal Português são considerados “inimputáveis”.

Um facto é ponto de concórdia entre os investigadores: os estudos epidemiológicos não são bem adaptados para acomodar o longo período de latência entre a exposição durante a infância e início da doença neurodegenerativa, nomeadamente a DA.

Em jeito de reflexão final há uma questão que se prende com os rápidos avanços científicos e tecnologias de utilização e escolha de biomarcadores no contexto médico-legal: ética e a prática em saúde ocupacional.

Os biomarcadores são amplamente utilizados em saúde ocupacional: fase de pré-emprego, teste preventivo ou preditivo.

O teste preventivo tem de uma forma global o objetivo de evitar acidentes que podem ocorrer se um trabalhador clinicamente inapto comprometer um trabalho; para trabalhos sensíveis de segurança, testes de rotina da capacidade funcional do trabalhador no emprego.

Contudo, os testes preditivos permitem prever o risco de um trabalhador vir a desenvolver uma determinada doença, ou seja, os objetivos podem variar e ter a intenção de excluir um trabalhador suscetível de trabalhar num ambiente perigoso, ou mesmo evitar a contratação de um trabalhador que é suscetível de desenvolver uma doença e que pode levar ao aumento dos custos, do empregador, com cuidados de saúde.

A questão pertinente a considerar é se o teste é realizado para beneficiar o indivíduo ou para atender alguma necessidade administrativa e/ou financeira.

Entre os trabalhadores expostos, o rastreio pode ser conduzida para biomarcadores de exposição ou efeito. No entanto, em biomarcadores não validados é necessário assegurar que os ensaios são precisos e eficazes, e que não são utilizados para discriminar indivíduos[86]. A medicina legal e a sua “preocupação” social!

A medicina legal é uma especialidade médica de carácter eminentemente informativo, como referia Gérard Mémeteau, com imenso e inegável interesse social. A medicina legal não é a medicina dos mortos. Pelo contrário, são muitos mais os exames que se efetuam nos vivos e para os vivos do que aqueles em que se intervém no cadáver ou não vivo.

5. Bibliografia

1. Paustenbach, D. and D. Galbraith, 2006, Biomonitoring: is body burden relevant to public health? *Regul Toxicol Pharmacol*, 44(3): p. 249-61.
2. Nieboer, E., *et al.*, 2013, Human biomonitoring issues related to lead exposure. *Environ Sci Process Impacts*, 15(10): p. 1824-9.
3. Hays, S.M., *et al.*, 2007, Biomonitoring equivalents: a screening approach for interpreting biomonitoring results from a public health risk perspective. *Regul Toxicol Pharmacol*, 47(1): p. 96-109.
4. Al Bakheet, S.A., *et al.*, 2013, Effect of long-term human exposure to environmental heavy metals on the expression of detoxification and DNA repair genes. *Environ Pollut*, 181: p. 226-32.
5. Monte, S.M., *et al.*, 2009, Epidemiological trends strongly suggest exposures as etiologic agents in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease, diabetes mellitus, and non-alcoholic steatohepatitis. *J Alzheimers Dis*, 17(3): p. 519-29.
6. Tong, S., Y.E.v. Schirnding, and T. Prapamontol, 2000, Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization*, 78: p. 1068-1077.
7. Basha, R. and G.R. Reddy, 2010, Developmental exposure to lead and late life abnormalities of nervous system. *Indian J Exp Biol*, 48(7): p. 636-41.
8. Farkhondeh, T., *et al.*, 2013, The effect of lead exposure on tracheal responsiveness to methacholine and ovalbumin, total and differential white blood cells count, and serum levels of immunoglobulin E, histamine, and cytokines in guinea pigs. *Hum Exp Toxicol*.
9. Faulk, C., *et al.*, 2013, Early-life lead exposure results in dose- and sex-specific effects on weight and epigenetic gene regulation in weanling mice. *Epigenomics*, 5(5): p. 487-500.
10. Silbergeld, E.K. and D.L. Davis, 1994, Role of biomarkers in identifying and understanding environmentally induced disease. *Clin Chem*, 40(7 Pt 2): p. 1363-7.
11. Agency, U.S.E.P., Date September, 2013, United States Environmental Protection Agency (EPA). Available from: <http://www2.epa.gov/lead>.
12. Diário da República, 23 de Outubro de 2007, Tabela Nacional de Incapacidades (TNI). p. 7715-7808.
13. Miller, S., *et al.*, 2013, Mercury-associated nephrotic syndrome: a case report and systematic review of the literature. *Am J Kidney Dis*, 62(1): p. 135-8.

14. Balkwill, F. and A. Mantovani, 2001, Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357(9255): p. 539-45.
15. Karin, M. and F.R. Greten, 2005, NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*, 5(10): p. 749-59.
16. Mantovani, A., *et al.*, 2002, Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, 23(11): p. 549-55.
17. Mantovani, A., *et al.*, 2008, Cancer-related inflammation. *Nature*, 454(7203): p. 436-444.
18. Greten, F.R., *et al.*, 2004, IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, 118(3): p. 285-96.
19. Pikarsky, E., *et al.*, 2004, NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature*, 431(7007): p. 461-6.
20. Balkwill, F., 1999, TNF biosynthesis in gut associated immunopathologies. *Gut*, 45(4): p. 483.
21. Giavazzi, R., *et al.*, 1990, Interleukin 1-induced augmentation of experimental metastases from a human melanoma in nude mice. *Cancer Res*, 50(15): p. 4771-5.
22. Figueiredo, C., *et al.*, 2002, Helicobacter pylori and interleukin 1 genotyping: an opportunity to identify high-risk individuals for gastric carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 94(22): p. 1680-7.
23. Tanaka, Y., *et al.*, 2003, Impact of interleukin-1beta genetic polymorphisms on the development of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma in Japan. *J Infect Dis*, 187(11): p. 1822-5.
24. Barber, M.D., *et al.*, 2000, A polymorphism of the interleukin-1 beta gene influences survival in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 83(11): p. 1443-7.
25. Jong, M.M., *et al.*, 2002, Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 11(11): p. 1332-52.
26. Hold, G.L., *et al.*, 2007, A functional polymorphism of toll-like receptor 4 gene increases risk of gastric carcinoma and its precursors. *Gastroenterology*, 132(3): p. 905-12.
27. Karin, M., *et al.*, 2002, NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*, 2(4): p. 301-10.
28. Bingle, L., N.J. Brown, and C.E. Lewis, 2002, The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*, 196(3): p. 254-65.

29. Dave, S.S., *et al.*, 2004, Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*, 351(21): p. 2159-69.
30. Balkwill, F., K.A. Charles, and A. Mantovani, 2005, Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 7(3): p. 211-7.
31. Tan, T.T. and L.M. Coussens, 2007, Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr Opin Immunol*, 19(2): p. 209-16.
32. Michalke, B. and V. Nischwitz, 2010, Review on metal speciation analysis in cerebrospinal fluid-current methods and results: a review. *Anal Chim Acta*, 682(1-2): p. 23-36.
33. Moulton, P.V. and W. Yang, 2012, Air pollution, oxidative stress, and Alzheimer's disease. *J Environ Public Health*, 2012: p. 472751.
34. Uitti, R.J., *et al.*, 1989, Regional metal concentrations in Parkinson's disease, other chronic neurological diseases, and control brains. *Can J Neurol Sci*, 16(3): p. 310-4.
35. Wu, J., *et al.*, 2008, Alzheimer's disease (AD)-like pathology in aged monkeys after infantile exposure to environmental metal lead (Pb): evidence for a developmental origin and environmental link for AD. *J Neurosci*, 28(1): p. 3-9.
36. Haschek, W.M., C.G. Rousseaux, and M.A. Wallig, 2010, Chapter 13 - Nervous System, in *Fundamentals of Toxicologic Pathology* (Second edition). Academic Press: San Diego. p. 377-410.
37. El-Fawal, H.A.N., 2011, Neurotoxicology, in *Encyclopedia of Environmental Health*, O.N. Editor-in-Chief: Jerome, Editor., Elsevier: Burlington. p. 87-106.
38. Ward, R.J., D.T. Dexter, and R.R. Crichton, 2012, Chelating agents for neurodegenerative diseases. *Curr Med Chem*, 19(17): p. 2760-72.
39. Faller, P. and C. Hureau, 2012, A bioinorganic view of Alzheimer's disease: when misplaced metal ions (re)direct the electrons to the wrong target. *Chemistry*, 18(50): p. 15910-20.
40. Pereira, C., *et al.*, 2005, Alzheimer's disease-associated neurotoxic mechanisms and neuroprotective strategies. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 4(4): p. 383-403.
41. Octave, J.N., 2005, Alzheimer disease: cellular and molecular aspects. *Bull Mem Acad R Med Belg*, 160(10-12): p. 445-9; discussion 450-1.
42. Ali-Torres, J., *et al.*, 2011, Structures and stabilities of Fe²⁺/3⁺ complexes relevant to Alzheimer's disease: an ab initio study. *J Phys Chem A*, 115(45): p. 12523-30.

43. Gu, H., *et al.*, 2011, Lead exposure increases levels of beta-amyloid in the brain and CSF and inhibits LRP1 expression in APP transgenic mice. *Neurosci Lett*, 490(1): p. 16-20.
44. Lessler, M.A., June, 1988, Lead and Lead Poisoning from Antiquity to Modern Times. *The Ohio Journal of Science*, 88(3): p. 78-84.
45. Hernberg, S., 2000, Lead poisoning in a historical perspective. *Am J Ind Med*, 38(3): p. 244-54.
46. Waldron, H.A., 1966, The Anaemia of Lead Poisoning: A review. *Br J Ind Med* 23: p. 83-100.
47. Montes-Santiago, J., 2013, The lead-poisoned genius: Saturnism in famous artists across five centuries. *Prog Brain Res*, 203: p. 223-40.
48. Kakosy, T. and G. Soos, 1995, An undying civilization damage: lead poisoning. *Orv Hetil*, 136(21): p. 1091-7.
49. Breeher, L., F. Gerr, and L. Fuortes, 2013, A case report of adult lead toxicity following use of Ayurvedic herbal medication. *J Occup Med Toxicol*, 8(1): p. 26.
50. Datko-Williams, L., A. Wilkie, and J. Richmond-Bryant, 2013, Analysis of U.S. soil lead (Pb) studies from 1970 to 2012. *Sci Total Environ*, 468-469c: p. 854-863.
51. Srianujata, S., 1998, Lead--the toxic metal to stay with human. *J Toxicol Sci*, 23 Suppl 2: p. 237-40.
52. Zahran, S., *et al.*, 2013, Determining the relative importance of soil sample locations to predict risk of child lead exposure. *Environ Int*, 60c: p. 7-14.
53. Marqués, F., 1993, *Plomo: Criterios Toxicologicos actuales para la vigilancia medica de trabajadores expuestos*. Madrid.
54. Kaczynska, K., M. Walski, and M. Szereda-Przestaszewska, 2013, Long-Term Ultrastructural Indices of Lead Intoxication in Pulmonary Tissue of the Rat. *Microsc Microanal*: p. 1-6.
55. Vallascas, E., *et al.*, 2013, Adipose tissue: Another target organ for lead accumulation? A study on sardinian children (Italy). *Am J Hum Biol*.
56. Zelikoff, J.T., *et al.*, 1988, Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis*, 9(10): p. 1727-32.
57. Joseph, A., *et al.*, 2013, A Pilot Study of Concurrent Lead and Cotinine Screening for Childhood Tobacco Smoke Exposure: Effect on Parental Smoking. *Am J Health Promot*.
58. McFarlane, A.C., *et al.*, 2013, Prospective associations between childhood low-level lead exposure and adult mental health problems: The Port Pirie cohort study. *Neurotoxicology*, 39c: p. 11-17.

59. Lead exposure in children: prevention, d., and management, Oct 2005, in Pediatrics. p. 1036-46.
60. Luszczek-Trojnar, E., *et al.*, 2013, Effect of long-term dietary lead exposure on some maturation and reproductive parameters of a female Prussian carp (*Carassius gibelio* B.). *Environ Sci Pollut Res Int*.
61. Akbal, A., E. Tutkun, and H. Yilmaz, 2013, Lead exposure is a risk for worsening bone mineral density in middle-aged male workers. *Aging Male*.
62. Verstraeten, S.V., L. Aimo, and P.I. Oteiza, 2008, Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. *Arch Toxicol*, 82(11): p. 789-802.
63. Haraguchi, T., *et al.*, 2001, Lead content of brain tissue in diffuse neurofibrillary tangles with calcification (DNTC): the possibility of lead neurotoxicity. *Neuroreport*, 12(18): p. 3887-90.
64. Marques, R.C., *et al.*, 2013, Breast Milk Lead Concentrations of Mothers Living Near Tin Smelters. *Bull Environ Contam Toxicol*.
65. Chelchowska, M., *et al.*, 2013, Tobacco smoke exposure during pregnancy increases maternal blood lead levels affecting neonate birth weight. *Biol Trace Elem Res*, 155(2): p. 169-75.
66. Liu, K.S., *et al.*, 2013, Neurotoxicity and Biomarkers of Lead Exposure: a Review. *Chin Med Sci J*, 28(3): p. 178-188.
67. Nemsadze, K., *et al.*, 2009, Mechanisms of lead-induced poisoning. *Georgian Med News*, (172-173): p. 92-6.
68. Vij, A.G., N.K. Satija, and S.J. Flora, 1998, Lead induced disorders in hematopoietic and drug metabolizing enzyme system and their protection by ascorbic acid supplementation. *Biomed Environ Sci*, 11(1): p. 7-14.
69. Wang, Y., *et al.*, 2013, Postnatal exposure to methyl mercury and neuropsychological development in 7-year-old urban inner-city children exposed to lead in the United States. *Child Neuropsychol*.
70. Kazi, T.G., *et al.*, 2013, Evaluation of lead levels in biological samples of mentally retarded children in different stages using advanced extraction method. *Environ Toxicol Pharmacol*, 36(3): p. 858-864.
71. Wu, J., M.R. Basha, and N.H. Zawia, 2008, The environment, epigenetics and amyloidogenesis. *J Mol Neurosci*, 34(1): p. 1-7.
72. Martinez-Zamudio, R. and H.C. Ha, 2011, Environmental epigenetics in metal exposure. *Epigenetics*, 6(7): p. 820-7.

73. Alatise, O.I. and G.N. Schrauzer, 2010, Lead exposure: a contributing cause of the current breast cancer epidemic in Nigerian women. *Biol Trace Elem Res*, 136(2): p. 127-39.
74. Wu, W.T., *et al.*, 2012, Brain cancer associated with environmental lead exposure: evidence from implementation of a National Petrol-Lead Phase-Out Program (PLPOP) in Taiwan between 1979 and 2007. *Environ Int*, 40: p. 97-101.
75. ORGANIZATION, W.W.H., 1995, Environmental Health Criteria 165 – Inorganic Lead. Geneva.
76. H, V., 1997, Lead and cancer -- association or causation? *Scand J Work Environ Health*, 23(1): p. 1-4.
77. Chan, C.P., *et al.*, 2013, Pb induces gastrin gene expression by extracellular signal-regulated kinases 1/2 and transcription factor activator protein 1 in human gastric carcinoma cells. *Environ Toxicol*.
78. Coelho, P., *et al.*, 2013, Genotoxic effect of exposure to metal(loid)s. A molecular epidemiology survey of populations living and working in Panasqueira mine area, Portugal. *Environ Int*, 60c: p. 163-170.
79. Wozniak, K. and J. Blasiak, 2003, In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutat Res*, 535(2): p. 127-39.
80. Bakulski, K.M., *et al.*, 2012, Alzheimer's disease and environmental exposure to lead: the epidemiologic evidence and potential role of epigenetics. *Curr Alzheimer Res*, 9(5): p. 563-73.
81. Cunha, M.E.S., 2008, Interação entre Mercúrio e Sistemas Biológicos, in *Toxic.*, Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto: Porto.
82. Sá, C., 2001, Análise de superfícies e interfaces por espectroscopia de electrões. CEMUP – Centro de Materiais da Universidade do Porto
83. Sá, C., 2007, Digital analyses of SEM images for materials characterization and interface/surface studies of biological materials. CEMUP – Centro de Materiais da Universidade do Porto, p. 3.1 - 4.19.
84. Church, H.J., *et al.*, 1993, The speciation of lead in erythrocytes in relation to lead toxicity: case studies of two lead-exposed workers. *Neurotoxicology*, 14(2-3): p. 359-64.
85. Moreira, A.M.O., 2010, Frequência dos polimorfismos genéticos ALAD (MspI) e VDR (BsmI), envolvidos na toxicocinética do Chumbo, numa população portuguesa, in *Contaminação e Toxicologia Ambientais*. Porto.

86. Koh, D. and J. Jeyaratnam, 1998, Biomarkers, screening and ethics. *Occup Med* (Lond), 48(1): p. 27-30.